

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
AGRONOMSKI FAKULTET

**BIOAKTIVNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA  
CVIJETA KAMILICE (*MATRICARIA  
CHAMOMILLA* L.)**

DIPLOMSKI RAD

Maja Pleša

Zagreb, rujan 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

Diplomski studij:  
Hortikultura – Povrćarstvo

**BIOAKTIVNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA  
CVIJETA KAMILICE (*MATRICARIA  
CHAMOMILLA* L.)**  
DIPLOMSKI RAD

Maja Pleša

Mentor: doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur

Zagreb, rujan 2017.

# **IZJAVA STUDENTA**

## **O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Maja Pleša**, JMBAG, 0178089652 rođen/a 16.03.1993. u Sisku, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**BIOAKTIVNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA CVIJETA KAMILICE (*MATRICARIA CHAMOMILLA* L.).**

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

*Potpis studenta / studentice*

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZVJEŠĆE**

**O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA**

Diplomski rad studentice Maje Pleša, JMBAG 0178089652, naslova

**BIOAKTIVNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA CVIJETA KAMILICE (*MATRICARIA CHAMOMILLAL.*)**

Obranjen je i ocijenjen ocjenom \_\_\_\_\_, dana \_\_\_\_\_.

Povjerenstvo:

Potpisi:

1. doc. dr. sc. Jana Šic Žlabur mentor

\_\_\_\_\_

2. izv. prof. dr. sc. Sandra Voća član

\_\_\_\_\_

3. izv. prof. dr. sc. Ivanka Žutić član

\_\_\_\_\_

## **Zahvala**

Ovim se zahvaljujem svojoj mentorici doc.dr.sc. Jani Šic Žlabur na iskazanom povjerenju, pomoći pri pisanju ovoga rada, strpljenju, prenošenju svoga znanja. Također veliko hvala djelatnicima laboratorija Zavod za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu koji su mi ustupili prostor i svu potrebnu aparaturu i kemikalije za istraživanje mog Diplomskog rada. Zahvaljujem se roditeljima i bratu koji su mi omogućili daljnje školovanje i bili mi velika podrška, također dečku i prijateljima koji su bili uz mene sve ovo vrijeme.

# Sadržaj

1.0.	Uvod .....	1
2.0.	Pregled literature .....	3
2.1.	Opis biljne vrste kamilica .....	3
2.2.	Morfološke karakteristike kamilice .....	3
2.3.	Ekološki zahtjevi i biološke karakteristike .....	4
2.4.	Priprema tla.....	5
2.5.	Sorte kamilice .....	5
2.6.	Uzgoj kamilice.....	6
2.7.	Proces prerade kamilice .....	7
2.8.	Kemijski sastav kamilice .....	8
2.9.	Ljekovita svojstva kamilice .....	9
2.10.	Ekstrakcija .....	9
2.10.1.	Ultrazvuk.....	10
3.0.	Materijali rada .....	11
3.1.	Biljni materijal .....	11
3.2.	Sušenje cvijeta kamilice .....	11
3.3.	Priprema uzorka za analizu.....	12
3.4.	Priprema uzorka za klasičnu ekstrakciju .....	13
3.5.	Priprema uzorka za ultrazvučnu ekstrakciju.....	14
4.0.	Metode rada.....	17
4.1.	Određivanje gustoće, topljive suhe tvari i volumnog sadržaja alkohola otopine .....	17
4.2.	Određivanje ukupne kiselosti .....	17
4.3.	Određivanje pH - vrijednosti .....	18
4.4.	Određivanje vitamina C.....	19
4.5.	Određivanje ukupnih fenola .....	20
4.6.	Određivanje flavonoida i neflavonoida .....	21
4.7.	Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom.....	21
4.8.	Statistička obrada podataka .....	23
5.0.	Rezultati i rasprava.....	24
5.1.	Osnovni kemijski sastav .....	24
5.2.	Bioaktivne komponente.....	27
5.2.1.	Sadržaj vitamina C .....	27
5.2.2.	Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida .....	31
5.3.	Antioksidacijski kapacitet vodenih i etanolnih uzoraka usitnjenog cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom.....	38
6.0.	Zaključci .....	42
7.0.	Popis literature.....	43
8.0.	Prilog .....	45
	Životopis.....	47

## Sažetak

Diplomskoga rada studentice Maja Pleša, naslova

### BIOAKTIVNI SPOJEVI U EKSTRAKTIMA CVIJETA KAMILICE

(*MATRICARIA CHAMOMILLA* L.)

Kamilica (*Matricaria chamomilla* L.) je poznata ljekovita, jednogodišnja biljka iz porodice *Asteraceae* koja se često naziva „zvijezda među ljekovitim vrstama“. Eterično ulje prisutno u cvatu sadrži azulen i koristi se u parfumeriji te farmaceutskoj industriji. Suhi cvat kamilice u velikoj je potražnji za upotrebu u biljnim čajevima. Kamilica sadrži veliku skupinu terapijski zanimljivih i biološki aktivnih spojeva od seskviterpena, flavonoida, kumarina do vitamina, fenolnih kiselina i glukozyda. Cilj ovog istraživanja bio je istražiti sadržaj bioaktivnih spojeva u etanolnom i vodenom ekstraktu cvijeta kamilice i ispitati utjecaj ultrazvučne ekstrakcije na prinos istih. Analizirani su vodeni i etanolni ekstrakti, i to: gustoća, topljiva suha tvar, ukupne kiseline, pH-vrijednost, volumni alkoholni sadržaj, vitamin C, ukupni fenoli (flavonoidi i neflavonoidi) i antioksidacijski kapacitet. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta značajno je smanjila vrijeme potrebno za ekstrakciju biljnog materijala. Ultrazvuk visokog intenziteta u usporedbi s klasičnim načinom ekstrakcije bioaktivnih spojeva iz cvijeta kamilice utječe na povećanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida.

**Ključne riječi:** kamilica, antioksidacijska aktivnost, ultrazvuk visokog intenziteta, klasična ekstrakcija, fenolni spojevi

## Summary

of master's thesis by student Maja Pleša, titled

### **BIOACTIVE COMPOUND IN EXTRACT OF CAMOMILE FLOWER**

**(*MATRICARIA CHAMOMILLA* L.)**

Camomile (*Matricaria chamomilla* L.) is well known as therapeutic, annual plant from *Asteraceae* kind which is often called “star among therapeutic sorts”. Essential oil present in floral parts contains azulene and is used in drugstores and pharmaceutical industry. Dry inflorescence of camomile is in demand for use in herbal tea. Camomile contains great group of therapeutically interesting and biological active compounds of sesquiterpenes, flavonoids, coumarins, vitamins, phenol acids and glucosides. The aim of this research was to examine content of bioactive compounds in ethanol and water extract of camomile flower. Moreover, examine the influence of ultrasound extraction on productivity of the same. In water and ethanol extracts have been analysed: density, dry matter content, total acids, pH- value, volume alcohol content, vitamin C content, total phenols (flavonoids and nonflavonoids) and antioxidant capacity. The use of high intensity ultrasound has significantly decreased time necessary for extraction of herbal material. High intensity ultrasound compared to the classic method of extracting bioactive compounds from the chamomile flower affects on the increase in the content of total phenols and flavonoids.

**Key words:** camomile, antioxidant activity, high intensity ultrasound, classical extraction, phenol compounds



## 1.0. Uvod

Kamilica (Slika 1) ljekovita je biljka čija su svojstva poznavali već stari Rimljani i Grci. Upotrebljava se cvat kamilice (*Chamomillae flos*) i eterično ulje (*Chamomillae aetheroleum*). Zbog specifičnog sadržaja eteričnog ulja kamilica ublažava i smiruje sve vrste upala djelujući kao antiseptik, antiflogistik i baktericid. Eterično ulje kamilice primjenjuje se u kozmetici i farmaciji za njegu kože, a uz to je sastavni dio lijekova protiv upale. Od cvata se pripremaju čajevi, kupelji i tinkture (Šilješ i sur., 1992).



Slika 1. Kamilica na polju (Foto: Maja Pleša, 2017)

Rod *Matricaria* pripada porodici glavočika. Kao pradomovina kamilice spominje se Mala Azija, ali je kao samonikla danas raširena u cijelom svijetu. Veći uzgajivači kamilice u svijetu su Argentina, Egipat, a zatim Mađarska. Kod nas se uzgaja na području Slavonije i Baranje na više od 600 ha (Šilješ i sur., 1992). Kamilica je jednogodišnja vrsta koja se može uzgajati kao monokultura, ali ne treba je na istoj površini uzgajati duže od dvije godine (McKay i Blumberg, 2006).

U cvatu kamilice identificirano je više od 120 kemijskih sastojaka, sekundarnih metabolita uključujući 28 terpenoida, 36 flavonoida i 52 spoja s potencijalnim farmaceutskim djelovanjem. Komponente kao što su  $\alpha$ -bisabolol i ciklički eteri ispoljavaju značajna antimikrobna svojstva, umbeliferon fungistatična, dok su kamazulen i  $\alpha$ -bisabolol snažni antiseptici (Sarivastava i Gupta, 2009). Osim navedenih spojeva iz skupine polifenola, zanimljivo je da cvat kamilice sadrži i vitamin C (Šilješ i sur., 1992). Većina navedenih spojeva ljudskom organizmu je dostupna nakon procesa ekstrakcije iz biljnog tkiva. Ekstrakcija je definirana kao postupak separacije (odvajanja) i izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom, a u kojem je pojedina tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka neke smjese (Gertenbach, 2001). Postojanjem dviju faza agregatnog stanja u nekoj smjesi, razlikujemo dva tipa ekstrakcije: tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid*) i čvrsto-tekuće (engl. *solid-liquid*; *solid-phase*). Tijekom ekstrakcije fenolnih

spojeva najčešće se koriste organska otapala poput etanola, acetona i metanola s različitim volumnim udjelima vode (Šic Žlabur, 2015). Metode koje su se donedavno koristile za ekstrakciju, poput ekstrakcije otapalima, vrućom vodom, lužinama i sl. mogu uzrokovati degradaciju bioaktivnih komponenti zbog primjene visokih temperatura, dugog vremena ekstrakcije ili loše određenih sigurnosnih kriterija tijekom procesa. Ekstrakcija bioaktivnih komponenti ultrazvukom visokog intenziteta (20-100 kHz) jedna je od novijih tehnika koje omogućuju visoku iskoristivost u kraćem vremenu, jednostavnije rukovanje, primjenu nižih temperatura te korištenje manjih količina organskih otapala (Drmić i Režek Jambrak, 2010).

## **1.1. Cilj rada**

Cilj ovog istraživanja bio je ispitati sadržaj bioaktivnih spojeva u etanolnom i vodenom ekstraktu cvata kamilice (*Matricaria chamomilla* L.). Također, ispitati utjecaj ultrazvučne ekstrakcije na prinos istih.

## 2.0. Pregled literature

### 2.1. Opis biljne vrste kamilica

Kamilica (*Matricaria chamomilla* L.) poznata i pod znanstvenim sinonimima (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert i *Matricaria recutita* L. (FCD, 2015), odnosno prava ili njemačka kamilica jednogodišnja je ljekovita biljka iz porodice glavočika (*Asteraceae*). Danas je zbog cijenjenog kemijskog sastava često upotrebljavana ljekovita biljka u narodnoj i tradicionalnoj medicini (McKay i Blumberg, 2006). Rimska kamilica (*Chamaemelum nobile* /L./ All.), ranije poznata kao *Anthemis nobilis* L., također pripada porodici *Asteraceae* i slična je njemačkoj kamilici. Važna je ljekovita i aromatična biljka čiji cvatovi imaju karakterističan miris trave. Međutim, morfološke su razlike između cvatova rimske i njemačke kamilice značajne. Nadalje, osim u morfološkim karakteristikama njemačka i rimska kamilica značajno se i kemijski razlikuju pogotovo u sadržaju i sastavu eteričnog ulja. Slijedom navedenog, njihova svojstva i upotreba su sasvim drugačije te je poznavanje razlika između rimske i njemačke kamilice nužno (Das, 2015).

Kamilica je širom svijeta poznata pod različitim imenima poput: kamilica, njemačka kamilica, mađarska kamilica, *Matricaria* cvijeće, slatka lažna kamilica, prava kamilica, divlja kamilica i Babuna. Carl Linnaeus napravio je pokušaj da sustavno klasificira kamilicu i dao joj botanički naziv *Matricaria*. Ime *Matricaria* izabrao je zbog široke primjene u liječenju ginekoloških bolesti ili „bolesti maternice“. Cvjetovi kamilice postupkom hidrodestilacije daju eterično ulje indigo plave boje koje se upotrebljava u izradi lijekova, kozmetici i hrani. Ekstrakti cvata sadrže brojne sekundarne metabolite kao što su kamazulen,  $\alpha$ -bisabolol, apigenin i luteolin, a od kojih su mnogi farmaceutski aktivni (Das, 2015).

### 2.2. Morfološke karakteristike kamilice

Korijen kamilice je račvast, ali uglavnom ne prodire duboko u tlo, što ponajprije ovisi o vlažnosti tla. Stabljika može biti visoka od 5 do 100 cm, uspravna ili povijena, što ovisi o više čimbenika, kao što su tip tla, gnojidba, sklop ili košnja (Šilješ i sur., 1992).

Listovi kamilice (Slika 2) su sjedeći, dvostruko do trostruko perasto razdijeljeni, uski, linearnih lisaka, svijetlozelene boje i goli bez dlačica (Šilješ i sur., 1992).

Cvjetne glavice imaju promjer 10-30 mm i nalaze se na peteljka (Slika 3). Zlatnožuti cjevasti cvjetovi dugi 1,5-2,5 mm, smješteni su centralno na ispupčenom cvjetištu širokom 6-8 mm. Jezičasti cvjetovi (11-27) bijele boje dugi su 6-11 mm, široki 3,5 mm, smješteni su rubno i koncentrično raspoređeni. Cvat je u početku ravan, a kasnije postaje konusno ispupčen (McKay i Blumberg, 2006).



Slika 2. List kamilice (www.gobotany.org)



Slika 3. Cvatovi kamilice (Foto: Maja Pleša, 2017)

### 2.3. Ekološki zahtjevi i biološke karakteristike

Kamilica zahtijeva umjerenu klimu i srednje temperature. Klija i raste već pri 6 °C, a za njezin rast i razvoj optimalne su temperature od 20 do 25 °C. Dnevne temperature niže od 20 °C negativno će se odraziti na kakvoću droge ako su prisutne u fazi oblikovanja cvjetnih glavica i nakupljanja eteričnog ulja. U fazi formiranja prvih listova i u fazi rozete kamilica nije osjetljiva na niske temperature, ali u slučaju da se prije nastupa zime već razviju stabljike može biti znatno oštećena niskim temperaturama. Kamilica pri klijanju zahtijeva prisutnost svjetlosti. Također, pomanjkanje svjetlosti nije poželjno u razdoblju od pupanja do punog cvata zato što cvat neće sadržavati dovoljne količine matricina, odnosno, prokamazulena, što će znatno smanjiti kvalitetu eteričnog ulja. Biljka kamilice dobro podnosi sušu, ali vlaga je posebno značajna u površinskom sloju tla nakon sjetve, jer u slučaju da nije stalno vlažna, sjeme neće proklijati. Uzgaja se na svim tipovima tla, osim na vrlo rastresitom vapnenačkom tlu, dok se na teškom, nepropusnom tlu tipa pseudogleja ostvaruju dobri prinosi (Šilješ i sur., 1992).



## 2.4. Priprema tla

Kvaliteta i prinos kamilice ovise ponajviše o izboru predkulture. Kamilici odgovara svaka predkultura kratke vegetacije jer je tlo potkraj kolovoza potrebno pripremiti za sjetvu. Kvalitetna priprema tla veoma je važna za uspješnu proizvodnju kamilice. Zbog rane sjetve, tlo se mora plitko izorati odmah poslije žetve predkulture. Rok rane sjetve treba odgoditi ako nema dovoljne količine oborina, jer bi zbog neželjenog nicanja predusjeva u usjevu kamilice trebalo primijeniti herbicid. Površina se ore do dubine 25 cm, a zatvaranje brazde potrebno je obaviti odmah, kao i pripremu sjetvenog sloja, kako se tlo ne bi zgrudalo i osušilo. Prije sjetve površinu treba izvaljati višedijelnim valjcima (Slika 4). Površina treba ostati ravna pa je jako bitno voditi brigu o brzini traktora s valjcima. Ovisno o tipu tla i strukturi površinskog sloja, valjanje se obavlja u nekoliko prohoda, važno je pripremiti ravnu i zbijenu površinu, na kojoj neće biti tragova propadanja sijačice (Šilješ i sur., 1992).



Slika 4. Valjanje površine (Foto: Maja Pleša, 2017)

## 2.5. Sorte kamilice

Postoje tetraploidne i diploidne sorte kamilice. Za strojnu berbu preporučuje se sjetva tetraploidnih sorata jer postižu ujednačenu visiu usjeva i daju više prinose cvata i eteričnog ulja (Šilješ i sur., 1992). Utvrđeno je da je sadržaj apigenin glukozida i njegovih glavnih aciliranih derivata u liguliformnim cvjetovima diploidnih biljaka znatno veći prije početka cvatnje u usporedbi s tetraploidnim biljkama. No, tijekom i nakon faze cvatnje njihova je količina smanjena, ali nema razlika između diploidnih i tetraploidnih biljaka. (E)-izomer je dominantni oblik 2-β-d-glukopiranoziloksi-4-metoksi cinamske kiseline. Ti prekursori metabolita stresa nagomilani su u većim koncentracijama u mladim liguliformnim cvjetovima, ali tijekom i nakon faze cvatnje njihov je sadržaj smanjen. U tetraploidnim biljkama pronađen

je znatno veći sadržaj u usporedbi s diploidnim biljkama. Aglikoni glikozida su pronađeni u niskim koncentracijama (Repčak i Krausova, 2009).

## 2.6. Uzgoj kamilice

Iako se kamilica može uzgajati na različitim tipovima tala, trebalo bi izbjeći njen uzgoj na tlima bogato opskrbljenim hranivima te onima koja su teška i vlažna. Također, može podnijeti niske temperature od 2 °C sve do -20 °C (Singh i sur., 2011). Za naše uvjete optimalnim rokom sjetve smatra se jesenski rok, koji se proteže od sredine rujna do kraja listopada. Zbog povećane potražnje za cvatom i eteričnim uljem kamilice povećavaju se sjetvene površine te se javlja problem berbe cvata jer nema dovoljno strojeva za branje. Taj se problem može riješiti sjetvom u nekoliko rokova, jer se u proljeće postiže produženo vrijeme cvatnje. Prvi rok sjetve može se obaviti sredinom rujna, a posljednji početkom studenog, pri čemu je od presudnog značaja pravilan raspored oborina u jesen. U kontinentalnom području jesenske suše su vrlo česte, pa usjevi brže niču i ujednačeno se razvijaju ako se sjetva obavi u drugom roku. Jake jutarnje rose vlaže površinu tla, a ako su dnevne temperature umjerene, površina se tla ne isušuje. Proljetna sjetva se ne provodi jer su prinosi niži najmanje 40 % u usporedbi s jesenskom sjetvom. Kamilica se sije plošno jer sjeme klija samo uz prisutnost svjetlosti. Za sjetvu su primjerene žitne sijačice kojima se skidaju ulagači (Slika 5). Za sjetvu se iskorištava mješavina u kojoj je 25 – 30 % sjemena, a ostatak je pulvis odgovarajuće sorte. Ovisno o klijavosti sjemena i o sorti, potrebno je 7 do 9 kg mješavine po hektaru. Sjetvu ne bi trebalo obavljati ako je jači vjetar jer se sjeme neće pravilno rasporediti po površini. Ako se sije u ranom roku obavezno je još jedno valjanje površina, a nije potrebno pri kasnijem roku jer tada je tlo vlažnije (Šilješ i sur., 1992).



Slika 5. Prerađena žitna sijačica (Foto: Maja Pleša, 2017)

## 2.7. Proces prerade kamilice

Osnova uspješnog uzgoja za proces prerade kamilice je berba cvata u vrhuncu cvatnje, 3-6 tjedana tijekom travnja i svibnja. Istovremeno se na biljci pojavljuju cvjetovi u svim fazama, ali najbolju kvalitetu krajnjeg proizvoda daju cvatovi pred punom cvatnjom (Mendešević, 2017). Prema stanju cvata određuje se zrelost kamilice za berbu. Optimalni rok berbe kamilice je kada je 70 % cvjetnih glavica tehnološki zrelo (još se ne oblikuje sjeme, latice su u vodoravnom položaju). Da bi se veći usjev kamilice mogao pobrati u optimalnom roku potrebno je produžiti jesenski rok sjetve. Ako to nije slučaj, berba može započeti prije, odnosno kad je 60 % glavica tehnološki zrelo. Ukoliko pak 5-6 dana poslije berbe padne kiša za dva tjedna se može obaviti još jedna berba kojom se dobiva i do 50 % prinosa prve berbe (Europlantaže, 2017).

Selektivna ručna berba ubraja se u jednu od skupljih faza uzgoja kamilice i nije izvediva na velikim proizvodnim površinama. Berba se vrši strojno uz pomoć posebnih kombajna velikog kapaciteta (Slika 6), kojima se gubi selektivnost ručne berbe (Mendešević, 2017). Strojnim načinom berbe u roku desetak sati požanje se 3-4 ha usjeva kamilice koji nije plegao, odnosno ubere se 12-16 t svježeg cvata. Prosječan prinos kada su optimalni klimatski uvjeti je 4 t/ha svježeg cvata, sa 60 % cvata prve klase (Europlantaže, 2017).



Slika 6. Strojna berba kamilice (Foto: Maja Pleša, 2017)

Ubrane cvatove treba odmah transportirati s uzgojne površine do mjesta gdje će se odvijati prerada i skladištenje na zasjenjenom mjestu. Svježi cvat kamilice, ovisno o kvaliteti provedene berbe, sadrži različite količine lišća, stabljike, korova te drugih nečistoća koje je potrebno ukloniti jer povećavaju potrošnju energije potrebne za sušenje ili destilaciju, produžuju vrijeme sušenja i podižu temperaturu u hrpama. Zbog nepravilnog skladištenjem u vrećama i boks paletama bez ventilacije može doći do promjene boje cvata već za nekoliko sati. Budući da se mikrobiološka kontaminacija povećava, grube nečistoće potrebno je ukloniti prije nego dođe do gubitka kvalitete krajnjeg proizvoda (Mendešević, 2017).

## 2.8. Kemijski sastav kamilice

Kamilica spada u kultivirane ljekovite biljke. Sadrži više skupina terapijski zanimljivih aktivnih tvari. Seskviterpeni, flavonoidi, kumarini i poliacetileni smatraju se najvažnijim komponentama kamilčinog ulja. Jedanaest bioaktivnih fenolnih spojeva, kao što su herniarin i umbeliferon (kumarini), klorogenska kiselina i kafeinska kiselina (fenilpropanoidi), apigenin, apigenin-7-O-glukozid, luteolin i luteolin-7-O-glukozid (flavoni), kvercetin i rutin (flavonoli) i naringenin (flavanon) nalaze se u ekstraktu kamilice (Singh i sur., 2011). Cvjetovi, odnosno cvjetne glavice glavni su organi u kojima se nakuplja eterično ulje (Slika 7). Značajno je da se kamilčino ulje uglavnom sastoji od seskviterpenskih derivata (75-90 %), a monoterpenske sastavnice sadrži u tragovima. Glavne sastavnice eteričnog ulja dobivenog iz cvata kamilice su: (E)- $\beta$ -farnezen (4,9-8,1 %), terpeniski alkohol (farnesol), kamazulen (2,3-10,9 %),  $\alpha$ -bisabolol (4,8-11,3 %),  $\alpha$ -bisabolol oksidi A (25,5-28,7 %) i  $\alpha$ -bisabolol oksidi B (12,2-30,9 %), koji imaju protuupalno, antiseptičko i spazmolitičko djelovanje. Kamilica je prirodni izvor kamazulena koji se u procesu hidrodestilacije formira iz matricina prisutnog u cvjetovima. Sadržaj kamazulena ovisi o sorti kamilice, podrijetlu, odnosno lokaciji uzgoja, kao i o roku berbe. Također, važno je naglasiti da se sadržaj kamazulena značajno smanjuje odgodom berbe te tijekom skladištenja cvata (MacKay i Blumberg, 2006). Singh i sur. (2011) preporučaju berbu obaviti u ranoj fazi cvatnje te sušenje cvata na zasjenjenim mjestima. Ustanovili su da su farnezen i bisabolol zastupljeni s najvišim vrijednostima u cvjetnim pupoljcima, a s najnižim u ocvalim cvatovima koji se raspadaju. Sadržaj kamazulena i bisabolola oksida povećava se od faze pupanja do faze potpuno razvijenih cvjetova.



Slika 7. Eterično ulje kamilice ([www.terra-organica.hr](http://www.terra-organica.hr))



## 2.9. Ljekovita svojstva kamilice

U tradicionalnom sustavu medicine kamilica se koristi u ljekovite svrhe, a njena je uotreba vođena farmakopejama. Farmakopeja (ljekopis), knjiga je sa službenim odredbama o načinu izrade, ispitivanju, čuvanju i doziranju lijekova (HL, 2017). To su službeni tekstovi koji određuju kako prepoznati biljku, koji biljni dio treba koristiti, koje su fizikalne i kemijske osobine lijeka i kako formulacije lijeka trebaju biti pripremljene i primijenjene na pacijentu. Ove specifikacije osiguravaju učinkovitost lijeka. Uz farmakopeje postoje i drugi službeni tekstovi kao što su kompendijumi i monografije koje pružaju smjernice za izradu učinkovitih formulacija i uporabu različitog ljekovitog bilja, pa tako i kamilice (Das, 2015).

Kao droga kod kamilice se koristi suhi cvat (*Matricariae/Chamomillae flos*). Alkoholni ili vodeni ekstrakti pripremaju se od suhog cvata. Koriste se u vidu vodenih pripravaka (čajeva), tinktura, tableta i obloga. Ekstrakti cvata i hidrodestilirano eterično ulje koriste se u izradi krema i losiona te u aromaterapiji. Vodeni i etanolni ekstrakti cvatova kamilice mogu sadržavati do 20 % suhe tvari, uključujući 20-25 % mineralnih tvari i 5 % slobodnih aminokiselina (Das, 2015). Za proizvodnju ekstrakata kamilice dobrog antiflogističkog učinka treba koristiti samo one kultivare kamilice koji imaju visoki sadržaj (-)- $\alpha$ -bisabolola. Čaj od kamilice je jedan od najpopularnijih biljnih čajeva na svijetu, a svakodnevno se konzumira gotovo milijun čaša (Singh i sur., 2011). Uz čaj, svježi cvjetovi kamilice mogu se dodati i pićima. Osušeni cvatovi mogu se koristiti kao sastojak u juhama i salatama za poboljšanje okusa i povećanje prehrambene vrijednosti. U ljekovite svrhe koristi se i eterično ulje dobiveno hidrodestilacijom iz cvata. Smjernice u mnogim farmakopejama navode da cvatovi koji se koriste u ljekovite svrhe trebaju imati najmanje 0,4 % sadržaja eteričnog ulja. Eterično ulje kamilice koristi se i za bojanje hrane. Budući da je djeluje antimikrobno, može se koristiti kao dodatak raznim prehrambenim proizvodima (Das, 2015). Svježe ulje bolje je kvalitete, a indigo plava boja služi kao indikator prisutnosti kamazulena (Singh i sur., 2011).

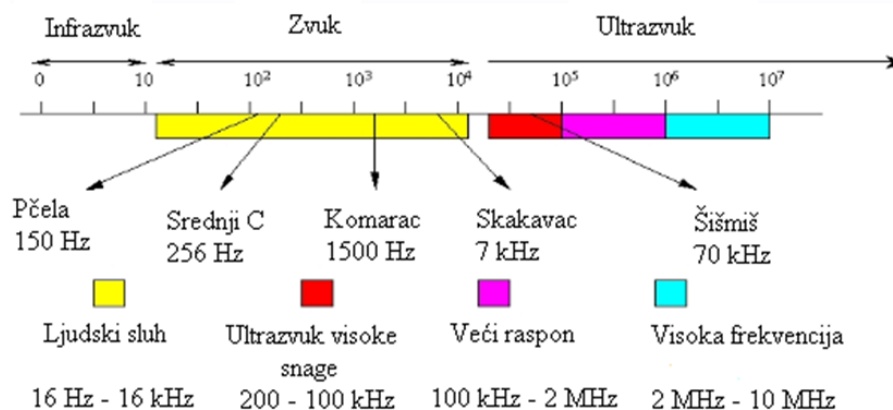
## 2.10. Ekstrakcija

Ekstrakcija je definirana kao postupak odvajanja i izdvajanja neke tvari iz čvrste ili tekuće smjese prikladnim otapalom, a u kojem je pojedina tvar topljiva ili ima bolju topljivost od preostalih sastojaka neke smjese (Gertenbach, 2001). Razlikujemo dva tipa ekstrakcije tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid*) i čvrsto-tekuće (engl. *solid-liquid*; *solid-phase*) (Šic Žlabur, 2015). Klasične metode koje su najčešće u upotrebi za potrebe ekstrakcije kemijskih spojeva iz biljnog materijala podrazumijevaju upotrebu adekvatnog otapala (najčešće vodene otopine etanola, metanola, ali i ostalih organskih otapala poput acetona i heksana), visokih temperatura i izmućkivanje (Vinatoru, 2001). Bioaktivni spojevi poput polifenolnih te različitih vitamina i pigmentnih spojeva izrazito su termolabilni, odnosno pri povišenim temperaturama mijenjanju svoju strukturu i degradiraju, te su klasični principi ekstrakcije takvih spojeva najčešće neadekvatni. U posljednje vrijeme razvijaju se brojne moderne tehnike ekstrakcije poput ekstrakcije mikrovalovima, super kritične ekstrakcije, ekstrakcije potpomognute tlakom i ultrazvukom. Navedene tehnike primjenjive su u ekstrakciji spojeva

različite kemijske strukture, a karakteristične su po neinvazivnim temperaturama i smanjenoj upotrebi organskih otapala (poput alkohola). Fenolni spojevi pokazuju visok stupanj degradacije, termolabilni su, osjetljivi na svjetlo, utjecaj patogena, mehaničko oštećenje tkiva biljne stanice itd. pa je odabir ekstrakcijske tehnike izrazito važan u cilju dobivanja što većih prinosa iz biljnih materijala (Šic Žlabur, 2015).

### 2.10.1. Ultrazvuk

Ultrazvuk je zvučni val frekvencija iznad ljudskog raspona sluha (Slika 8) od 20 Hz do oko 20 kHz (Villamiel i sur., 1999). Kao i sve zvučne valove karakteriziraju ga: amplituda (A), frekvencija (f), valna duljina ( $\lambda$ ) i koeficijent atenuacije (a). Razlikujemo ultrazvuk niskog intenziteta koji podrazumijeva intenzitete manje od  $1 \text{ W/cm}^2$  i frekvencije više od 100 kHz i ultrazvuk visokog intenziteta koji uključuje intenzitete u rasponu od 10 do  $1000 \text{ W/cm}^2$  i frekvencije između 18 i 100 kHz. Ultrazvuk niskog intenziteta se koristi kao analitička metoda u kemiji te kao dijagnostička metoda u medicini, dok se ultrazvuk visokog intenziteta koristi pri različitim tehnologijskim procesima u obradi hrane poput: čišćenja, odzračivanja tekućina, homogenizacije, sušenja, ekstrakcije, destilacije, uklanjanja nepoželjnih mikroorganizama, ekstrakcije, sterilizacije itd. (Brnčić i sur., 2009). Glavni mehanizam djelovanja ultrazvuka visokog intenziteta je prijelazna kavitacija. Osnovni proces djelovanja ultrazvuka u nekom tekućem mediju je kavitacija. Kavitacija je proces formiranja mjehurića plina u tekućem mediju uslijed djelovanja ultrazvučnog polja (Suslick i sur., 2011). Učinak ultrazvuka je puno korisniji pri nižim frekvencijama (18–40 kHz), dok je praktično zanemariv u rasponu od 400–800 kHz jer kod nižih frekvencija dominiraju mehanički učinci fenomena kavitacije kao što su turbulencije i strujanje tekućine (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Novija istraživanja su dokazala kako oslobođena toplina prilikom implozije mjehurića nije glavni letalni mehanizam ultrazvuka s obzirom na to da je oslobođena toplina izrazito lokalizirana i brzo nestaje. Smatra se da su šok valovi tlaka koji se razvijaju tijekom implozije mjehurića glavni mehanizam inaktivacije mikroorganizama. Prijelazna kavitacija je glavni letalni mehanizam ultrazvuka. Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitaciju ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, intenzitetu), svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) i okolnim uvjetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti) (Šic Žlabur, 2015).



Slika 8. Područja podjele zvuka prema frekvencijama (Atav, 2013)

### 3.0. Materijali rad

#### 3.1. Biljni materijal

Za potrebe istraživanja uzgojena je kamilica sorte 'Pitoma'. Sjetva je obavljena od 15.10. do 1.11.2016. na površinama od 34 ha u Kutini. Prije sjetve izvršeni su sljedeći agrotehnički zahvati: oranje na dubini od 30 cm, usitnjavanje tla rotodrljačom i valjanje. Budući da će uzgoj za 2 godine biti u ekološkoj proizvodnji, nisu korištena mineralna gnojiva niti sredstva za zaštitu od biljnih štetočinja. Cvatovi kamilice ubrani su 26.5.2017. strojnim vučenim kombajnom. Ubrani cvatovi transportirani su do sušnica Termoplin gdje je proveden postupak sušenja.

#### 3.2. Sušenje cvijeta kamilice

Sušnica „Termoplin“ prvenstveno je namijenjena za sušenje plantažnog i samoniklog ljekovitom bilja, povrća, korjenastog bilja, koštica buče i zrnatih kultura (Slika 9). Sušnice su izgrađene u montažno – demontažnoj varijanti. Sušenje cvata kamilice (Slika 10) provedeno je umjetnim putem, indirektnim zagrijavanjem zraka pomoću termogeneratorskog tipa „TGN“ koji kao energent koristi tekuće gorivo i drvene pelete. Sušenje je provedeno pri temperaturi od 42-45 °C u trajanju od 24 sata. Osušeni cvatovi pakirani su u kartonske kutije i skladišteni u zatvorenom i suhom prostoru.



Slika 9. Sušnice za sušenje ljekovitog bilja (Foto: Maja Pleša, 2017)



Slika 10. Sušenje cvatova kamilice u sušari (Foto: Maja Pleša, 2017)

### 3.3. Priprema uzorka za analizu

Suhi materijal dopremljen je na Zavod za poljoprivrednu tehnologiju, skladištenje i transport Agronomskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu gdje su provedena sva ostala istraživanja. Uklonjeni su cvatovi s vidljivim oštećenjima, a odabrani su zdravi i neoštećeni. Suhi cvatovi usitnjeni su laboratorijskim mlinom u prah kako bi učinak ekstrakcije bio veći (Slika 11). Također, suhom materijalu postupkom konvencijskog sušenja pri 105 °C (AOAC, 1995) određen je sadržaj suhe tvari koji je iznosio 89,28 % .



Slika 11. Usitnjeni cvatovi kamilice (Foto: Maja Pleša, 2017)

### 3.4. Priprema uzorka za klasičnu ekstrakciju

Za potrebe klasične ekstrakcije na tehničkoj vagi s točnošću  $\pm 0,01$  g odvagano je 2,5 g usitnjene mase suhog cvata i dodano 100 mL destilirane vode različite temperature: sobne (21,4 °C), 40 °C i 60 °C. Tako pripremljeni uzorci cvatova kamilice ekstrahirani su u različitim vremenskim intervalima i to: 5, 15, 25 i 35 minuta (Tablica 1). Nakon svakog pojedinog vremenskog perioda uzorci su profiltrirani preko običnog Whatmanovog filter papira kako bi se zaustavila daljnja ekstrakcija.

Za potrebe klasične ekstrakcije osim destilirane vode kao otapalo je korišten alkohol etanol u različitim koncentracijama: 20, 50 i 80 % (v/v) prilikom čega su uzorci pripremljeni na isti način, odnosno na 2,5 g suhog cvata kamilice dodano je 100 mL etanola u navedenim koncentracijama i ekstrahirano tijekom 5, 15, 25 i 35 min (Tablica 1). Nakon svakog vremenskog perioda uzorci su profiltrirani preko običnog Whatmanovog filter papira.

Tablica 1. Dizajn eksperimenta klasične ekstrakcije

Način ekstrakcije	Otapalo	Volumen otapala (mL)	Vrijeme (min)	Uzorak
Klasična	Destilirana voda (21,4 °C)	100	5	A1
Klasična	Destilirana voda (21,4 °C)	100	15	A2
Klasična	Destilirana voda (21,4 °C)	100	25	A3
Klasična	Destilirana voda (21,4 °C)	100	35	A4
Klasična	Destilirana voda (40 °C)	100	5	A5
Klasična	Destilirana voda (40 °C)	100	15	A6
Klasična	Destilirana voda (40 °C)	100	25	A7
Klasična	Destilirana voda (40 °C)	100	35	A8
Klasična	Destilirana voda (60 °C)	100	5	A9
Klasična	Destilirana voda (60 °C)	100	15	A10
Klasična	Destilirana voda (60 °C)	100	25	A11
Klasična	Destilirana voda (60 °C)	100	35	A12
Klasična	Etanol 20 %	100	5	a13
Klasična	Etanol 20 %	100	15	a14
Klasična	Etanol 20 %	100	25	a15
Klasična	Etanol 20 %	100	35	a16
Klasična	Etanol 50 %	100	5	a17
Klasična	Etanol 50 %	100	15	a18
Klasična	Etanol 50 %	100	25	a19
Klasična	Etanol 50 %	100	35	a20
Klasična	Etanol 80 %	100	5	a21
Klasična	Etanol 80 %	100	15	a22
Klasična	Etanol 80 %	100	25	a23
Klasična	Etanol 80 %	100	35	a24

### 3.5. Priprema uzorka za ultrazvučnu ekstrakciju

Dizajn eksperimenta ultrazvučne ekstrakcije prikazan je u Tablici 2. Uzorci kamilice za potrebe ultrazvučne ekstrakcije pripremljeni su na isti način kao i za potrebe klasične, odnosno na tehničkoj vagi s točnošću  $\pm 0,01$  g odvagano je 2,5 g usitnjene mase suhog cvata kamilice te dodano 100 mL otapala: destilirane vode (sobne temperature, ugrijane na 40 °C i 60 °C) i etanola (20, 50 i 80 % v/v). Odmah po dodavanju otapala uzorci su uronjeni u ultrazvučnu kupelj RK 103 H, (Bandelin, Njemačka) (Slika 12), frekvencije 35 kHz, snage 140 W i ekstrahirani u vremenskom trajanju od 5, 15, 25, 35 minuta. Važno je naglasiti kako je kod uzoraka kamilice tretirane ugrijanom vodom na 40 i 60 °C u ultrazvučnoj kupelji također održavana navedena temperatura. Tijekom ultrazvučne ekstrakcije mjerena je temperatura uzoraka svakih 30 s, a promjena temperature vodenih i etanolnih uzoraka kamilice tijekom ultrazvučne ekstrakcije prikazana je u Grafikonima 1 i 2. Nakon ultrazvučne ekstrakcije uzorci su profiltrirani preko Whatmanovog filter papira.

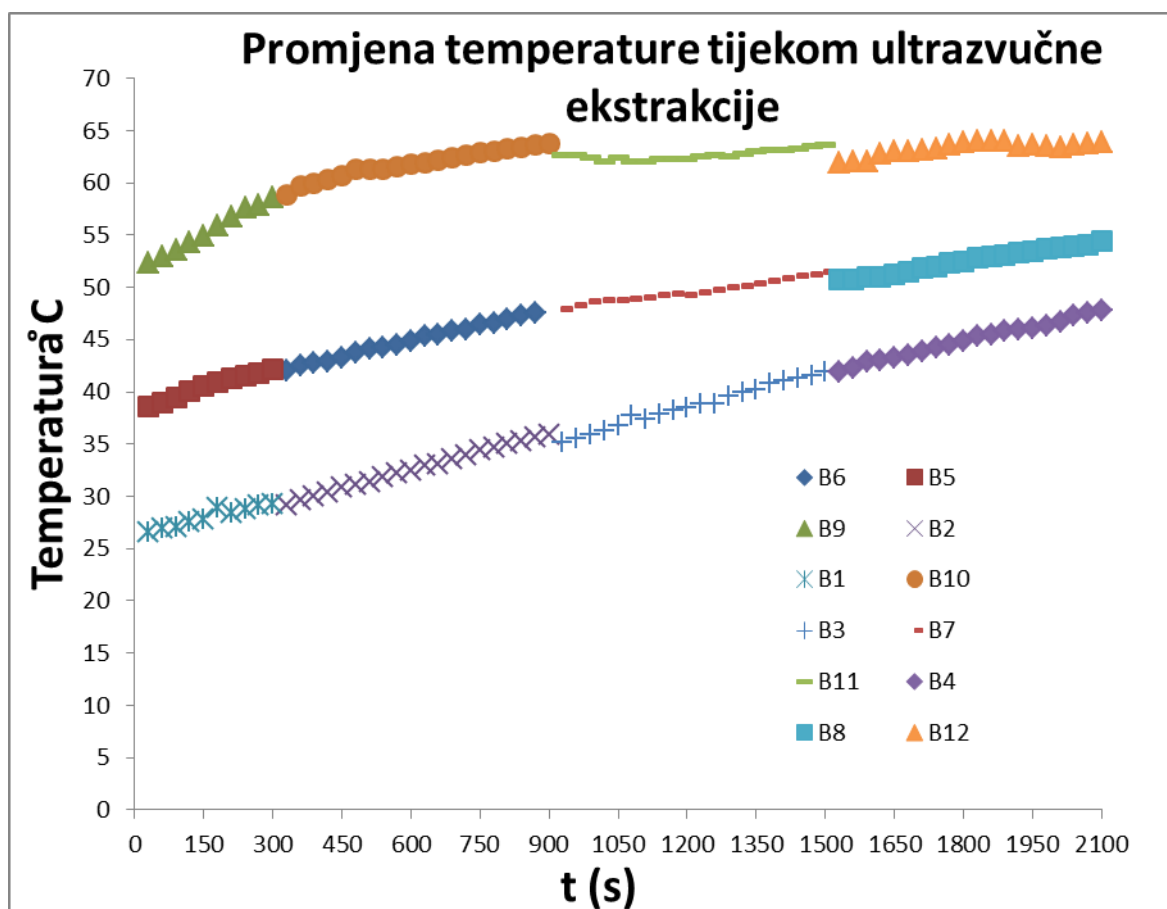
Tablica 2 . Dizajn eksperimenta ultrazvučne ekstrakcije

Način ekstrakcije	Otapalo	Volumen otapala (mL)	Vrijeme (min)	Ultrazvučna kupelj	Uzorak
UZV	Destilirana voda (21,4 °C)	100	5	35 kHz 140 W	B1
UZV	Destilirana voda (21,4 °C)	100	15	35 kHz 140 W	B2
UZV	Destilirana voda (21,4 °C)	100	25	35 kHz 140 W	B3
UZV	Destilirana voda (21,4 °C)	100	35	35 kHz 140 W	B4
UZV	Destilirana voda (40 °C)	100	5	35 kHz 140 W	B5
UZV	Destilirana voda (40 °C)	100	15	35 kHz 140 W	B6
UZV	Destilirana voda (40 °C)	100	25	35 kHz 140 W	B7
UZV	Destilirana voda (40 °C)	100	35	35 kHz 140 W	B8
UZV	Destilirana voda (60 °C)	100	5	35 kHz 140 W	B9
UZV	Destilirana voda (60 °C)	100	15	35 kHz 140 W	B10
UZV	Destilirana voda (60 °C)	100	25	35 kHz 140 W	B11
UZV	Destilirana voda (60 °C)	100	35	35 kHz 140 W	B12
UZV	Etanol 20%	100	5	35 kHz 140 W	b13
UZV	Etanol 20%	100	15	35 kHz 140 W	b14
UZV	Etanol 20%	100	25	35 kHz 140 W	b15
UZV	Etanol 20%	100	35	35 kHz 140 W	b16
UZV	Etanol 50%	100	5	35 kHz 140 W	b17
UZV	Etanol 50%	100	15	35 kHz 140 W	b18
UZV	Etanol 50%	100	25	35 kHz 140 W	b19
UZV	Etanol 50%	100	35	35 kHz 140 W	b20
UZV	Etanol 80%	100	5	35 kHz 140 W	b21
UZV	Etanol 80%	100	15	35 kHz 140 W	b22
UZV	Etanol 80%	100	25	35 kHz 140 W	b23
UZV	Etanol 80%	100	35	35 kHz 140 W	b24

UZV- ultrazvučna ekstrakcija

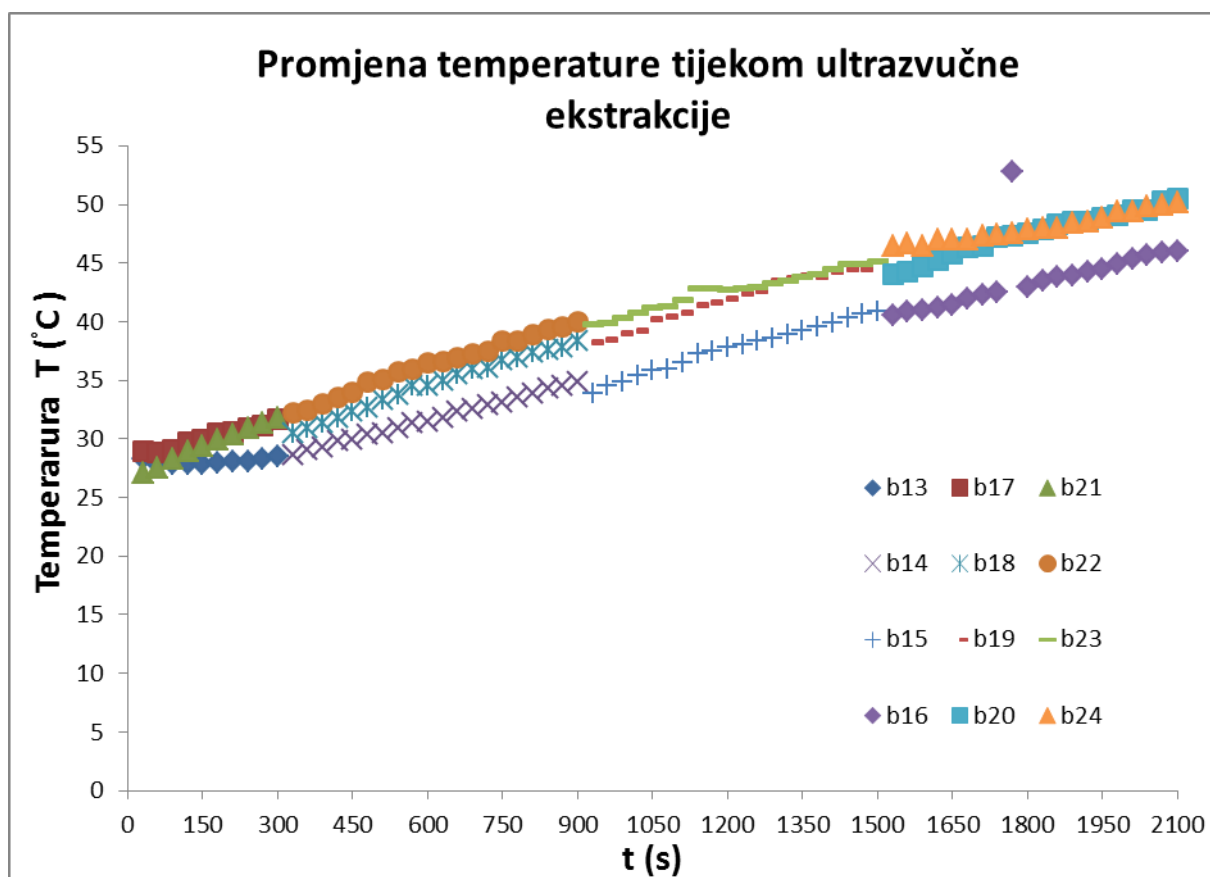


Slika 12. Ultrazvučna kupelj „Bandelin“ RK 103H (Foto: Maja Pleša, 2017)



Grafikon 1. Promjena temperature (°C) uzoraka vodenih ekstrakata usitnjenog cvata kamilice tijekom ultrazvučnog tretmana (B1 – B12) u vremenskim intervalima od 30 sekundi





Grafikon 2. Promjena temperature (°C) etanolnih ekstrakata usitnjenog cvata kamilice tijekom ultrazvučnog tretmana (b13 – b24) u vremenskim intervalima od 30 sekundi



## 4.0. Metode rada

U istraživanju su analizirani vodeni i etanolni ekstrakti suhog cvata kamilice. Provedene su analize sljedećih kemijskih parametara: gustoće otopine ( $\text{g/cm}^3$ ), topljive suhe tvari (TST) (%), ukupne kiselosti (%), pH- vrijednosti, vitamina C ( $\text{mg}/100 \text{ g}$ ), ukupnih fenola (flavonoidi i neflavonoidi) ( $\text{mg/L}$ ) i antioksidacijskog kapaciteta ( $\mu\text{mol TE/L}$ ). Sve laboratorijske analize provodile su se u tri repeticije. Rezultati su statistički obrađeni analizom varijance, a dobivene prosječne vrijednosti uspoređene LSD testom na razini signifikantnosti od  $p=0,01$ .

### 4.1. Određivanje gustoće, topljive suhe tvari i volumnog sadržaja alkohola otopine

Gustoća otopine ( $\text{g/cm}^3$ ) kao i sadržaj topljive suhe tvari (%) istraživanih vodenih uzoraka određeni su digitalnim denziometrom (Slika 13) „Mettler-Toledo“ Densito 30PX (Švicarska) direktnim očitanjem vrijednosti s uređaja. Etanolnim ekstraktima osim gustoće određen je i volumni sadržaj alkohola (vol. %) također digitalnim denziometrom.



Slika 13. Digitalni denziometar (Foto: Maja Pleša, 2017)

### 4.2. Određivanje ukupne kiselosti

Metoda određivanja ukupne kiselosti temelji se na potenciometrijskoj titraciji otopinom natrijeva hidroksida (AOAC, 1995).

*Aparatura i pribor:* pipeta, odmjerna tikvica (volumena 100 mL), analitička vaga (Sartorius), bireta (volumena 100 mL), graduirana pipeta (volumena 25 i 100 mL), potenciometar sa staklenom elektrodom (Mettler Toledo, Sevenmulti), čaše, magneti, magnetska mješalica (MM-510).

*Reagensi:* puferna otopina poznatog pH, natrijev hidroksid, otopina c (NaOH) = 0,1 mol/L.

*Priprema uzorka:* Odvagne se 10g uzorka u odmjernu tikvicu volumena 100 mL, tikvica se do oznake nadopuni destiliranom vodom te se sadržaj dobro promućka. U čašu u kojoj se nalazi magnet koji će pospješiti miješanje uzorka, otpipetira se 20 mL uzorka. Čaša se prenese na magnetsku miješalicu koja je prethodno puštena u rad. pH-metar se baždari pomoću standardne puferne otopine. Kada se pH-metar ustabili iz birete se dodaje otopina natrijevog hidroksida sve dok pH ne bude od 7,90 do 8,01.

Konačni sadržaj kiselina određuje se prema formuli:

$$\text{Ukupne kiseline (\%)} = \frac{V \times F \times G}{D} \times 100$$

Gdje je:

V (mL) - volumen otopine NaOH utrošene pri titraciji

F - faktor otopine NaOH c = 0,1 mol/L

G (g/mL) - faktor najzastupljenije kiseline u uzorku

D (g) – masa uzorka u 100 mL razrijeđenog homogeniziranog uzorka

### 4.3. Određivanje pH - vrijednosti

pH-vrijednosti uzoraka određene su pH-metrom, uranjanjem kombinirane elektrode u uzorak i očitavanjem vrijednosti (AOAC, 1995).

*Aparatura i pribor:* pH-metar (Mettler Toledo, Sevenmulti, Švicarska), analitička vaga (Sartorius), čaša volumena 25 mL, magnetska miješalica (MM-510), magneti za miješanje.

*Priprema uzorka:* postupak pripreme uzoraka za određivanje pH vrijednosti isti je kao i za ukupne kiseline.

*Postupak određivanja:* Prije samog mjerenja pH-metar se baždari pufernom otopinom kod sobne temperature. Uranjanjem elektrode u uzorak ispituje se pH vrijednost (Slika14).



Slika 14. Određivanje pH vrijednosti (Foto: Maja Pleša, 2017)

#### 4.4. Određivanje vitamina C

2,6-diklorindofenol oksidira L-askorbinsku kiselinu u dehidroaskorbinsku kiselinu, dok boja reagensa ne prijeđe u bezbojnu leukobazu, pa služi istovremeno i kao indikator ove redoks reakcije (AOAC, 2002).

*Aparatura i pribor:* analitička vaga (Sartorius), bireta 50 mL, odmjerna tikvica volumena 100 mL, Erlenmeyerova tikvica volumena 250 mL.

*Reagensi:* 2%-tna oksalna kiselina, 2,6-p-diklorindofenol

*Priprema uzorka:* U odmjernu tikvicu volumena 100 mL odvaže se 10 g uzorka. Tikvica se do oznake nadopuni 2%-tnom oksalnom kiselinom.

*Postupak određivanja:* Iz odmjerne tikvice otpipetira se 10 mL uzorka u Erlenmeyerovu tikvicu te se ista titrira otopinom 2,6-diklorindofenolado pojave ružičaste boje koja mora biti postojana barem 10 sekundi. Iz utrošenog volumena 2,6-diklorindofenola, izračunava se količina L-askorbinske kiseline (vitamin C) prema formuli:

$$\text{Vitamin C (mg/100g)} = \frac{V \times F}{D} \times 100$$

Gdje je:

V (mL) – volumen utrošenog 2,6-dikloridofenola pri titraciji

F - faktor normaliteta 2,6-diklorindofenola

D (g) –masa uzorka u gramima

#### **\*Određivanje faktora otopine 2,6-diklorindofenola:**

Kako bi se odredio faktor otopine 2,6-diklorindofenola prethodno je napravljena otopina askorbinske kiseline koja će se titrirati s otopinom 2,6-diklorindofenola. Prema utrošenom volumenu otopine 2,6-diklorindofenola za titraciju poznate mase standarda vitamina C izračunava se faktor te otopine. U odmjernu tikvicu volumena 50 mL na vagi se odvažuje  $\pm 0,0100$  g askorbinske kiseline i tikvica se do oznake nadopuni 2%-tnom otopinom oksalne kiseline. U Erlenmeyerovu tikvicu volumena 50 mL odpipetira se 5 mL prethodno pripremljene askorbinske kiseline i 5 mL 2%-tne otopine oksalne kiseline te titrira otopinom 2,6-diklorindofenolom do pojave ružičaste boje koja mora biti postojana 10 sekundi. Iz očitano g volumena otopine 2,6-diklorindofenola utrošenog za titraciju određene mase askorbinske kiseline izračunava se faktor (F) otopine 2,6-diklorindofenola.

### **4.5. Određivanje ukupnih fenola**

Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski u vodenom i etanolnom ekstraktu uzorka mjerenjem nastalog intenziteta obojenja pri valnoj duljini od 750 nm prema metodi Shukla i sur. (2012). Metoda se bazira na kolornoj reakciji fenola s Folin-Ciocalteu reagensom. Folin-Ciocalteu reagens je smjesa fosfomolibden i fosfotungstične kiseline, a pri oksidaciji fenolnih spojeva ove kiseline reduciraju se u volfram-oksidi i molibden-oksidi koji su plavo obojeni.

*Aparatura i pribor:* odmjerna tikvica volumena 50 mL, kivete, spektrofotometar (Schimadzu, UV 1650 PC), tehnička vaga (s točnošću  $\pm 0,001$ ).

*Reagensi:* Folin-Ciocalteu reagens, zasićena otopina natrijeva karbonata.

*Izrada baždarnog pravca:* Odvažuje se 500 mg galne kiseline, otopi u 80%-tnom etanolu i u odmjernoj tikvici volumena 100 mL nadopuni do oznake. Od otopine galne kiseline u odmjernu tikvicu volumena 100 mL pripreme se razrjeđenja, tako da se otpipetira 0, 1, 2, 3, 5 i 10 mL standarda (stock otopina) u svaku tikvicu i do oznake nadopuni 80%-tnim etanolom. Koncentracije galne kiseline u tikvicama iznose 0, 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. U odmjernu tikvicu volumena 50 mL, odpipetira se 0,5 mL uzorka u svaku tikvicu, dodaje redom 30 mL destilirane vode, 2,5 mL Folin-Ciocalteu reagensa i 7,5 mL zasićene otopine natrijevog karbonata. Nadopunjava se do oznake destiliranom vodom i promiješa. Uzorci se ostavljaju da stoje dva sata na sobnoj temperaturi. Apsorbancija se mjeri pri valnoj duljini 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu. Iz dobivenih apsorbancija nacrtava se baždarni pravac, tako da na apscisi bude koncentracija galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije.

*Priprema uzorka i određivanje sadržaja:* 1 mL pripremljenih vodenih i etanolnih uzoraka kamilice i 1 mL Folin-Ciocalteu reagensa (razrijeđenog vodom u omjeru 1:2) dodaje se u odmjernu tikvicu volumena 50 mL. Pripremljena otopina ostavi se 3 min pri sobnoj temperaturi. Nakon 3 min otopini se dodaje 3 mL zasićene otopine natrijeva karbonata, te se

tikvica do oznake nadopuni destiliranom vodom. Pripremljeni uzorci ostave se 2 sata pri sobnoj temperaturi uz povremeno mućkanje. Nakon 2 sata provedena su očitavanja fenolnih spojeva na spektrofotometru (Shimadzu UV 1650 PC) uz destiliranu vodu kao slijepu probu pri valnoj duljini od 750 nm.

Račun: Koncentracija ukupnih fenola izračuna se prema jednadžbi pravca koja se dobije pomoću programa Microsoft Excel.

Jednadžba pravca glasi:

$$y = 0,001 x + 0,0436$$

y - apsorbancija na 750 nm

x – koncentracija galne kiseline (mg/L)

#### 4.6. Određivanje flavonoida i neflavonoida

Sadržaj ukupnih flavonoida vodenih i etanolnih ekstrakata cvata kamilice određen je prema Abou-Arab i Abou-Salem (2010). Sadržaj neflavonoidnih spojeva izražen je iz razlike ukupnih fenola i flavonoida..

*Aparatura i pribor:* filter papir, stakleni lijevci, Erlenmeyer-ova tikvica sa šlifom i čepom volumena 25 mL, pipeta volumena 1 mL, staklene kivete, spektrofotometar (Schimadzu, UV 1650 PC).

*Reagensi:* klorovodična kiselina (20 % v/v), formaldehid, dušik za propuhivanje uzorka, zasićena otopina natrijevog karbonata, Folin- Ciocalteu reagens.

*Priprema uzorka i postupak određivanja:* u odmjernu tikvicu volumena 25 mL redom se doda: 1 mL ekstrakta, 1 mL klorovodične kiseline (20 % v/v) i 0,5 mL formaldehida. Pripremljeni uzorci propušu se dušikom i ostave 24 sata pri sobnoj temperaturi na tamnom mjestu. Nakon 24 sata prema istom protokolu kao i za ukupne fenolne spojeve napravljena je reakcija s Folin-Ciocalteu reagensom. Intenzitet nastalog plavog obojenja izmjeren je na spektrofotometru Shimadzu UV 1650 PC pri valnoj duljini od 750 nm uz destiliranu vodu kao slijepu probu..

#### 4.7. Određivanje antioksidacijskog kapaciteta ABTS metodom

Metoda se temelji na gašenju stabilnog plavo-zelenog radikal-kationa 2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolin-6-sulfonsa kiselina) (ABTS + radikal-kationa) koji se oblikuje bilo kemijskom ili enzimatskom oksidacijom otopine ABTS-a čiji je karakterističan adsorpcijski maksimum pri valnoj duljini od 734 nm. U prisutnosti antioksidansa ABTS+ kation se reducira u ABTS, s reakcija se očituje obezbojenjem plavo-zelene otopine. Udio uklonjenih ABTS radikala koji „gase“ različiti antioksidansi mjeri se prćenjem smanjenja apsorbancije

ABTS radikala te se uspoređuje sa smanjenjem apsorbancije koju uzrokuje dodatak određene količine Troloxa (6-hidroksi-2,5,6,7,8-tetrametilkroman-2-karbonska kiseline) pri istim uvjetima (Miller i sur., 1993; Re i sur., 1999).

Priprema reagensa:

1. dan:

- 140 mM otopine kalijeva persulfata,  $K_2S_2O_8$  (0,1892 g  $K_2S_2O_8$  izvaže se i otopi u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)
- 7 mM ABTS otopina (0,0192 g ABTS reagensa otopi se u 5 mL destilirane vode u odmjernoj tikvici od 10 mL)
- Stabilna  $ABTS^+$  otopina (88  $\mu$ L  $K_2S_2O_8$  otopine (140 mM) prenese se u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine ABTS-a. Sadržaj tikvice se dobro promiješa, zatvori, obloži aluminijskom folijom i ostavi stajati 12-16 sati pri sobnoj temperaturi. Stajanjem intenzitet plavo-zelene boje se pojačava).

2. dan:

Na dan provođenja svih analiza priprema se 1%-tn otopina  $ABTS^+$  (1 mL  $ABTS^+$  otopine otpipetira se u odmjernu tikvicu od 100 mL i nadopuni 96%-tnim etanolom do oznake). Nakon toga mjeri se apsorbanca 1%-tne otopine  $ABTS^+$  pri 734 nm koja mora iznositi  $0,70 \pm 0,02$ . Ako apsorbanca otopine ne iznosi 0,734 onda ju je potrebno namjestiti, odnosno ako je apsorbanca premala u tikvicu od 100 mL pripremljene 1%-tne otopine  $ABTS^+$  treba dodati još par kapi stabilne  $ABTS^+$  otopine, a ako je apsorbanca prevelika onda treba razrijediti odnosno u tikvicu od 100 mL dodati još 96%-tnog etanola.

*Postupak određivanja (spektrofotometrijski):* 160  $\mu$ L uzoraka pomiješa se sa 2 mL 1 %-tne otopine  $ABTS^+$  te se nakon 5 minuta mjeri apsorbanca pri 734 nm. Za slijepu probu se koristi 96%-tni etanol.

*Izrada baždarnog pravca:* Za izradu baždarnog pravca u ATBS metodi koristi se Trolox koji uzrokuje smanjenje boje  $ABTS^+$  otopine. Točke određene za izradu baždarnog pravca su sljedeće: 0, 100, 200, 400, 1000, 2000 i 2500 mol/dm<sup>3</sup>.

Najprije se pripremi stock otopina i to tako da se u odmjernoj tikvici od 25 mL izvaže 0,0156 Trolox-a, a tikvica se 80%-tnim etanolom nadopuni do oznake. Iz stock otopine uzimaju se sljedeći volumni Trolox-a za pripremu daljnjih razrjeđenja koja se pripremaju u odmjernim tikvicama od 25 mL;

- 0 → 0 mL Troloxa (samo EtOH)
- 100 → 0,4 mL
- 200 → 0,8 mL
- 400 → 1,6 mL
- 1000 → 4 mL
- 2000 → 8 mL
- 2500 → 10 mL

Nakon pripreme navedenih koncentracija Trolox-a iz svake tikvice u kojoj je navedena koncentracija Trolox-a uzima se 160  $\mu$ L otopine Trolox-a i dodaje 2 mL 1%-tne ABTS<sup>+</sup> otopine podešene apsorbance ( $0,70 \pm 0,02$ ). Nakon što pomiješamo dodanu koncentraciju Trolox-a i 1%-tne ABTS<sup>+</sup> otopine izmjeri se apsorbance pri 734 nm. I tako za svaku točku koncentracije Trolox-a. Temeljem izmjerenih vrijednosti apsorbance za svaku točku napravi se baždarni pravac.

#### **4.8. Statistička obrada podataka**

Rezultati istraživanja statistički su obrađeni u programskom paketu SAS/STAT (2010), verzija 9.3; SAS Institute, Cary, NC, SAD. Svaki tretman klasične i ultrazvučne ekstrakcije vodenog i alkoholnog uzorka s dodanim usitnjenim suhim cvatom kamilice napravljen je u 2 ponavljanja ( $n=2$ ). Rezultati su podvrgnuti jednosmjernoj analizi varijance (ANOVA). Srednje vrijednosti uspoređene su t-testom (LSD), a smatraju se značajno različitim prema  $p \leq 0,0001$ . Uz rezultate u tablicama nalaze se i eksponenti različitih slova koji označavaju značajne statističke razlike između promatranih kemijskih parametara kod  $p \leq 0,0001$ . Vrijednostima standardne devijacije (s) prikazano je prosječno odstupanje rezultata od srednje vrijednosti za pojedini kemijski parametar.

## 5.0. Rezultati i rasprava

### 5.1. Osnovni kemijski sastav

Rezultati osnovnog kemijskog sastava vodenih i etanolnih uzoraka cvata kamilice ekstrahiranih klasično (A1 – a24) i ultrazvukom (B1 – b24) prikazani su u Tablici 2, a obuhvaćaju: gustoću otopine, sadržaj topljive suhe tvari, sadržaj ukupnih kiselina i pH-vrijednost. Analizom varijance dobivenih rezultata za sve istraživane parametre osnovnog kemijskog sastava utvrđene su vrlo značajne statističke razlike ( $p \leq 0,0001$ ) između svih istraživanih uzoraka ovisno o načinu ekstrakcije (klasično, ultrazvuk), vremenskom periodu ekstrakcije (5-35 min), upotrijebljenom otapalu (destilirana voda i etanol) te temperaturi otapala (21,4, 40 i 60 °C).

Gustoća otopine vodenih uzoraka ekstrahiranih klasično i ultrazvukom bila je u rasponu od 0,9986 (A1) do 1,0004 g/cm<sup>3</sup> (B8), a etanolnih uzoraka ekstrahiranih klasično i ultrazvukom od 0,8587 (b21) do 0,9764 g/cm<sup>3</sup> (b16). Najveća gustoća otopine utvrđena je u uzorku (1,0004 g/cm<sup>3</sup>) B8 koji je ekstrahiran ultrazvukom u vremenskom razdoblju od 35 minuta. Jedna od glavnih posljedica primjene ultrazvuka visokog intenziteta je pojava prijelazne kavitacije koja između ostalog uzrokuje povećanje temperature sustava što može utjecati na niz fizikalnih svojstava otopine, a između ostalog i na njenu gustoću (Bosiljkov i sur., 2012). Vodeni uzorci cvata kamilice tretirani ultrazvukom u dužim vremenskim periodima (15 – 35 minuta) imali su najviše vrijednosti gustoće. Temeljem navedenog, očekivano je da uzorci koji su tretirani ultrazvukom nevezano uz vrstu otapala imaju i veću gustoću, a što je posljedica porasta temperature sustava prikazane u Grafikonima 1 i 2. S obzirom na otapalo, općenito su vodeni uzorci imali veću gustoću od etanolnih što je i očekivano s obzirom na činjenicu da voda ima veću gustoću od etanola.

Sadržaj topljive suhe tvari određen je samo u uzorcima u kojima je kao otapalo primijenjena destilirana voda i bio je u rasponu od 0,50 (A1) do 1,01 % (B12) u uzorcima koji su ekstrahirani klasično i ultrazvukom. Prosječni sadržaj topljive suhe tvari vodenih uzoraka ekstrahiranih klasično iznosi 0,73 %, dok za vodene uzorke ekstrahirane ultrazvučno prosječni sadržaj iznosi 0,85 %. Temeljem navedenih rezultata niskog sadržaja topljive suhe tvari (prosječne vrijednosti za sve ekstrakte od 0,79%) može se zaključiti kako vodeni ekstrakti cvata kamilice nisu bogat izvor šećera bez obzira na način ekstrakcije. Uzorci tretirani ultrazvukom pokazuju trend rasta topljive suhe tvari ovisno o primijenjenim vremenskim intervalima od 5 – 35 minuta. Najviša vrijednost topljive suhe tvari (1,01 %) utvrđena je za uzorak B12 u kojem je cvijet kamilice ekstrahiran 35 minuta ultrazvukom.

Najviši sadržaj ukupnih kiselina (1,16 %) utvrđen je kod vodenog uzorka (B12) tretiranog ultrazvukom kod kojeg je ekstrakcija trajala 35 minuta. Prosječni sadržaj ukupnih kiselina za vodene uzorke u kojima je cvat kamilice ekstrahiran klasično u vremenskom periodu od 5 min do 35 min iznosi 0,68 %, dok za etanolne uzorke u kojima je cvat kamilice ekstrahiran klasično u vremenskom periodu od 5 min do 35 min sadržaj ukupnih kiselina iznosi 0,03 %. Prosječni sadržaj ukupnih kiselina u vodenim ekstraktima tretiranim ultrazvukom u razdoblju od 5 min do 35 min iznosi 0,89 %, a za etanolne uzorke tretirane ultrazvukom u razdoblju od 5 min do 35 min sadržaj iznosi 0,03 %. Dokazane su značajne razlike u sadržaju ukupnih kiselina s obzirom na način ekstrakcije. Uzorci tretirani



ultrazvukom pokazuju veće vrijednosti sadržaja ukupnih kiselina. Također, postoje i značajne razlike ovisno o upotrijebljenom otapalu, gdje uzorci s vodom sadrže znatno više ukupnih kiselina nego uzorci s etanolom. Sadržaj ukupnih kiselina rastao je ovisno o vremenskom periodu tretiranja, što je vrijeme tretiranja bilo duže to je i sadržaj ukupnih kiselina bio viši. U skladu s utvrđenim niskim vrijednostima ukupnih kiselina, pH- vrijednosti bile su relativno visoke te prosječno za vodene uzorke tretirane klasično iznosi 5,42, dok za etanolne uzorke tretirane klasično 4,85. Za vodene uzorke tretirane ultrazvukom utvrđena je prosječna pH- vrijednost od 5,25, a etanolne uzorke tretirane ultrazvukom 4,83 prilikom čega se može zaključiti kako primjena ultrazvuka nije značajno utjecala na pH- vrijednost ekstrakata.

Sadržaj volumnog postotka alkohola (vol. %) određen je samo u uzrocima u kojima je cvat kamilice tretiran alkoholom (etanolom) u sljedećim postocima 20, 50 i 80 % (v/v) te je bio u rasponu od 15,40 (b16) do 78,25 % (b21). Način ekstrakcije (klasično, ultrazvuk) nije značajno utjecao na promjenu volumnog postotka alkohola u pripremljenim ekstraktima, no vremenski period značajno jest. Naime, tijekom ultrazvučne ekstrakcije biljnog materijala etanolom, posude nisu bile hermetički zatvorene prilikom čega je došlo do značajnog isparavanja alkohola odnosno do značajnog smanjenja volumnog postotka u periodu od 5-35 min.

Tablica 3. Osnovni kemijski sastav vodenih (A) i etanolnih (a) uzoraka cvata kamilice ekstrahiranih klasično

Uzorak	Gustoća (g/cm <sup>3</sup> ) *	TST (%) ***	Uk. Kis. (%) *	pH NS	Vol. (%) ***
A1	0,9986 <sup>j</sup>	0,50 <sup>k</sup> ±0,01	0,43 <sup>q</sup>	5,52 <sup>a</sup> ±0,01	ND <sup>u</sup>
A2	0,9991 <sup>h,i</sup>	0,63 <sup>i</sup> ±0,01	0,55 <sup>o</sup>	5,53 <sup>a</sup>	ND <sup>u</sup>
A3	0,9996 <sup>f</sup>	0,78 <sup>f,g</sup> ±0,03	0,73 <sup>i</sup>	5,41 <sup>a,b</sup>	ND <sup>u</sup>
A4	0,9996 <sup>f</sup>	0,79 <sup>f,g</sup> ±0,02	0,70 <sup>j</sup>	5,52 <sup>a</sup>	ND <sup>u</sup>
A5	0,9986 <sup>j</sup>	0,53 <sup>j</sup>	0,45 <sup>p</sup>	5,52 <sup>a</sup>	ND <sup>u</sup>
A6	0,9992 <sup>h</sup>	0,70 <sup>h</sup> ±0,03	0,62 <sup>m</sup>	5,42 <sup>a,b</sup>	ND <sup>u</sup>
A7	0,9995 <sup>f, g</sup>	0,79 <sup>f,g</sup> ±0,02	0,69 <sup>j</sup>	5,43 <sup>a,b</sup>	ND <sup>u</sup>
A8	0,9997 <sup>e, f</sup>	0,81 <sup>e,f</sup> ±0,01	0,76 <sup>h</sup>	5,42 <sup>a, b</sup>	ND <sup>u</sup>
A9	0,9989 <sup>i</sup>	0,63 <sup>i</sup> ±0,01	0,58 <sup>n</sup>	5,33 <sup>a,b,c,d</sup>	ND <sup>u</sup>
A10	0,9996 <sup>f, g</sup>	0,80 <sup>e,f</sup> ±0,01	0,78 <sup>g</sup>	5,34 <sup>a,b,c</sup> ±0,01	ND <sup>u</sup>
A11	0,9999 <sup>d, e</sup>	0,89 <sup>c</sup> ±0,01	0,88 <sup>e</sup>	5,27 <sup>b,c,d,e</sup>	ND <sup>u</sup>
A12	0,9999 <sup>d, e</sup>	0,90 <sup>c</sup> ±0,01	0,93 <sup>d</sup>	5,30 <sup>b,c,d</sup> ±0,01	ND <sup>u</sup>
a13	0,9729 <sup>p</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t</sup>	5,06 <sup>g,h,i,j</sup> ±0,04	19,10 <sup>m</sup> ±0,14
a14	0,9739 <sup>o</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t,s</sup> ±0,01	5,08 <sup>e,f,g,h,i,j</sup> ±0,11	18,25 <sup>n</sup> ±0,07
a15	0,9741 <sup>n, o</sup>	ND <sup>l</sup>	0,04 <sup>r</sup>	5,31 <sup>b, c, d</sup> ±0,01	17,95 <sup>o</sup> ±0,07
a16	0,9743 <sup>n</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>r, s</sup>	5,34 <sup>a,b, c</sup> ±0,03	17,75 <sup>p</sup> ±0,07
a17	0,9306 <sup>t</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t</sup>	5,00 <sup>j, k</sup> ±0,13	47,85 <sup>f</sup> ±0,07
a18	0,9309 <sup>s</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>t, r, s</sup>	4,80 <sup>l, m</sup> ±0,36	47,70 <sup>g</sup>
a19	0,9309 <sup>s</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>t, r, s</sup>	5,20 <sup>b, c, d, e, f</sup> ±0,05	47,60 <sup>g</sup>
a20	0,9322 <sup>r</sup>	ND <sup>l</sup>	0,04 <sup>r</sup> ±0,01	5,03 <sup>i, j, k</sup> ±0,05	47,00 <sup>l</sup>
a21	0,8613 <sup>u</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t, s</sup>	4,57 <sup>m</sup> ±0,12	77,65 <sup>d, e</sup> ±0,07
a22	0,8616 <sup>u</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t, s</sup>	4,25 <sup>n</sup> ±0,11	77,60 <sup>e</sup>
a23	0,8606 <sup>v</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>r, s</sup>	4,20 <sup>n</sup> ±0,03	77,85 <sup>b, c</sup> ±0,07
a24	0,8609 <sup>v</sup>	ND <sup>l</sup>	0,04 <sup>r</sup>	4,30 <sup>n</sup> ±0,04	77,75 <sup>c, d</sup> ±0,07

\*0,01 ≤ p ≤ 0,05; \*\*\* p ≤ 0,0001; NS- nije signifikantno; TST- topljiva suha tvar; ND- nije determiniran sadržaj

Tablica 4. Osnovni kemijski sastav vodenih (B) i etanolnih (b) uzoraka sa usitnjenim cvatom kamilice ekstrahiranih ultrazvukom.

Uzorak	Gustoća (g/cm <sup>3</sup> ) *	TST (%) ***	Uk. Kis. (%) *	pH NS	Vol. (%) ***
B1	0,9993 <sup>g, h</sup>	0,65 <sup>e, c</sup> ±0,01	0,63 <sup>l</sup>	5,33 <sup>a, b, c, d</sup> ±0,06	ND <sup>u</sup>
B2	0,9999 <sup>d, e</sup>	0,81 <sup>e, f</sup> ±0,01	0,77 <sup>g, h</sup>	5,25 <sup>b, c, d, e, f, g, h</sup> ±0,06	ND <sup>u</sup>
B3	1,0000 <sup>c, d</sup>	0,82 <sup>d, e</sup> ±0,01	0,87 <sup>e</sup>	5,18 <sup>c, d, e, f, g, h, i</sup> ±0,04	ND <sup>u</sup>
B4	1,0002 <sup>a, b, c</sup>	0,90 <sup>c</sup> ±0,02	0,98 <sup>c</sup>	5,25 <sup>b, c, d, e, f, g, h</sup> ±0,14	ND <sup>u</sup>
B5	0,9993 <sup>g, h</sup>	0,68 <sup>h</sup> ±0,01	0,65 <sup>k</sup>	5,31 <sup>b, c, d</sup> ±0,06	ND <sup>u</sup>
B6	0,9999 <sup>d, e</sup>	0,84 <sup>d</sup>	0,84 <sup>f</sup>	5,24 <sup>b, c, d, e, f, g, h</sup> ±0,05	ND <sup>u</sup>
B7	1,0001 <sup>b, c, d</sup>	0,88 <sup>c</sup>	0,93 <sup>d</sup>	5,20 <sup>c, d, e, f, g, h, i</sup>	ND <sup>u</sup>
B8	1,0004 <sup>a</sup>	0,95 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	5,20 <sup>c, d, e, f, g, h, i</sup>	ND <sup>u</sup>
B9	0,9995 <sup>f, g</sup>	0,76 <sup>g</sup>	0,77 <sup>g, h</sup>	5,23 <sup>b, c, d, e, f, g, h</sup>	ND <sup>u</sup>
B10	1,0002 <sup>a, b, c</sup>	0,95 <sup>b</sup> ±0,02	0,99 <sup>c</sup>	5,28 <sup>b, c, d, e</sup> ±0,02	ND <sup>u</sup>
B11	1,0000 <sup>c, d</sup>	0,93 <sup>b</sup>	1,05 <sup>b</sup>	5,26 <sup>b, c, d, e, f, g</sup>	ND <sup>u</sup>
B12	1,0003 <sup>a, b</sup>	1,01 <sup>a</sup>	1,16 <sup>a</sup>	5,25 <sup>b, c, d, e, f, g, h</sup>	ND <sup>u</sup>
b13	0,9751 <sup>m</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>r, s</sup>	4,85 <sup>k, l</sup> ±0,03	16,75 <sup>q</sup> ±0,07
b14	0,9755 <sup>l</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>r, s</sup>	5,08 <sup>e, f, g, h, i, j</sup> ±0,02	16,55 <sup>r</sup> ±0,07
b15	0,9757 <sup>l</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>r, s</sup>	5,20 <sup>c, d, e, f, g, h, i</sup> ±0,03	16,10 <sup>s</sup>
b16	0,9764 <sup>k</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>t, r, s</sup>	5,06 <sup>h, i, j</sup> ±0,01	15,40 <sup>t</sup>
b17	0,9306 <sup>t</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t, s</sup>	5,07 <sup>f, g, h, i, j</sup> ±0,09	47,30 <sup>h</sup> ±0,14
b18	0,9320 <sup>f</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>r, s</sup>	5,15 <sup>c, d, e, f, g, h, i, j</sup> ±0,04	46,50 <sup>j</sup>
b19	0,9330 <sup>q</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>t, r, s</sup>	5,13 <sup>d, e, f, g, h, i, j</sup> ±0,06	46,05 <sup>k</sup> ±0,07
b20	0,9332 <sup>q</sup>	ND <sup>l</sup>	0,03 <sup>r, s</sup>	5,16 <sup>c, d, e, f, g, h, i, j</sup> ±0,02	45,75 <sup>l</sup> ±0,07
b21	0,8587 <sup>y</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t, s</sup>	4,22 <sup>n</sup> ±0,01	78,25 <sup>a</sup> ±0,14
b22	0,8592 <sup>x</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t, s</sup>	4,35 <sup>n</sup> ±0,15	77,95 <sup>b</sup> ±0,07
b23	0,8596 <sup>w</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t, s</sup>	4,36 <sup>n</sup> ±0,01	77,80 <sup>c</sup> ±0,14
b24	0,8595 <sup>w</sup>	ND <sup>l</sup>	0,02 <sup>t, s</sup>	4,33 <sup>n</sup> ±0,06	77,65 <sup>d, e</sup> ±0,07

\*0,01 ≤ p ≤ 0,05; \*\*\* p ≤ 0,0001; NS- nije signifikantno; TST- topljiva suha tvar; ND- nije determiniran sadržaj

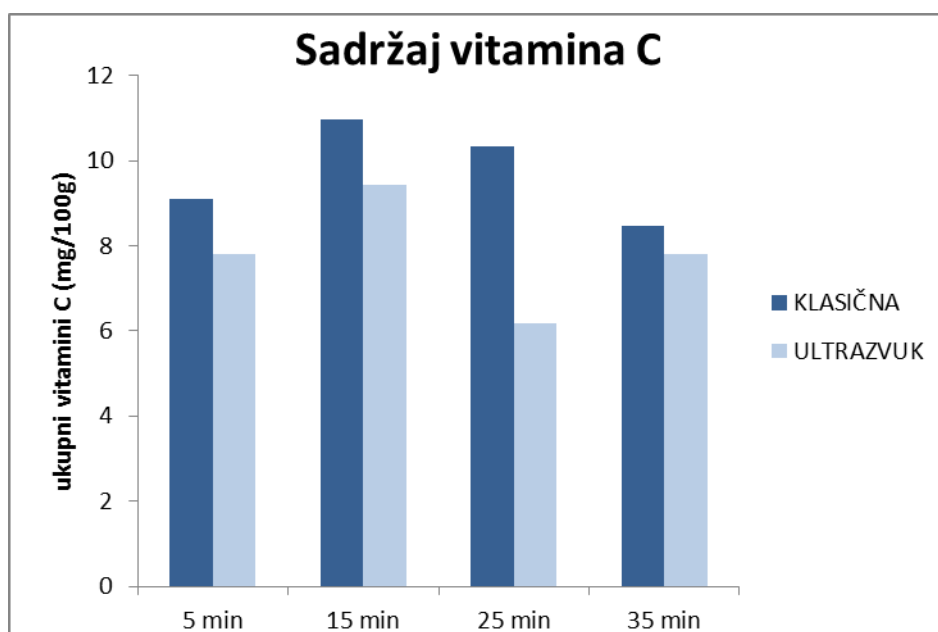
## 5.2. Bioaktivne komponente

Rezultati sadržaja bioaktivnih komponenti obuhvaćaju sadržaj: vitamina C, ukupnih fenola, flavonoida, ne flavonoida, te antioksidacijskog kapaciteta. Analizom varijance dobivenih rezultata istraživanih bioaktivnih spojeva utvrđene su vrlo značajne statističke razlike (p ≤ 0,0001) između svih istraživanih uzoraka ekstrahiranih klasično (A1 – a24) i ultrazvukom visokog intenziteta (B1 – b24) (Tablica 5 i 6, Prilog).

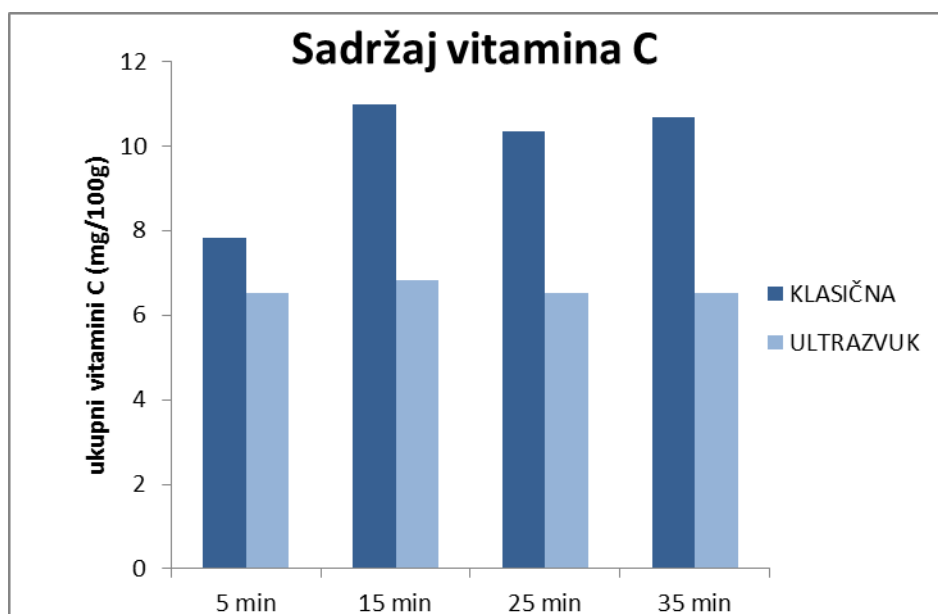
### 5.2.1. Sadržaj vitamina C

Vrijednosti sadržaja vitamina C (mg/100g) u uzorcima cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom prikazani u Grafikonima od 3 do 8. Vrijednosti vitamina C u vodenim uzorcima ekstrahiranih klasično kreću se u rasponu od 7,85 (A5) do 10,99 (A2, A6) mg/100 g, a etanolnih uzoraka od 8,95 (a16) do 15,99 (a24) mg/100g. Sadržaj vitamina C u vodenim uzorcima ekstrahiranih ultrazvukom kreću se u rasponu od 6,19 (B3) do 9,44 (B2) mg/100 g,

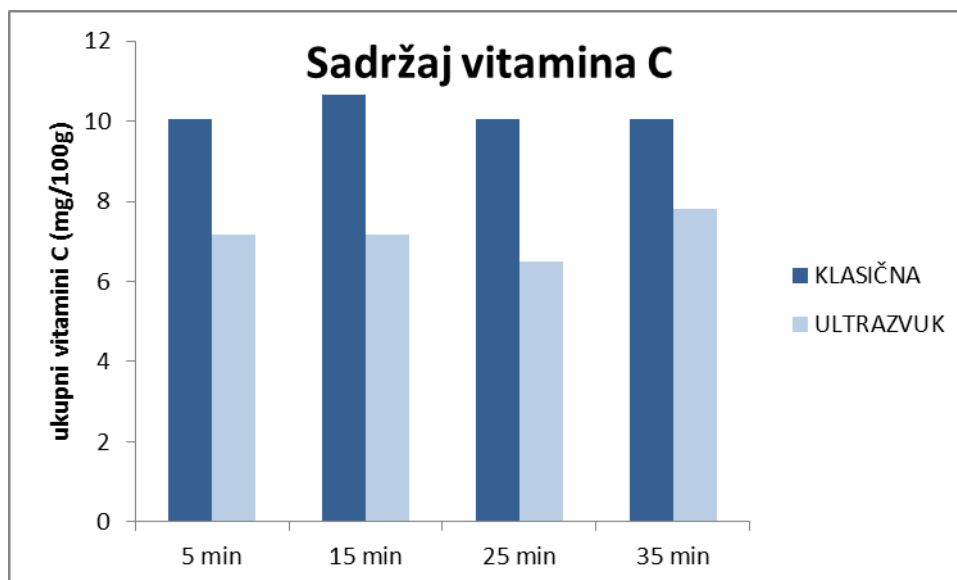
dok kod etanolnih uzoraka u rasponu od 8,45 (b15) do 15,36 mg/100 g (b24). Najviša vrijednost vitamina C (15,99 mg/100 g) utvrđena je u 80 %-tnom etanolnom uzorku u kojem su cvatovi kamilice ekstrahirani klasično u trajanju od 35 minuta (a24). Prema navedenim rezultatima, može se zaključiti da tretman ultrazvukom nije značajno utjecao na povećanje sadržaja vitamina C. Šilješ i sur. (1992) navode da cvat kamilice sadrži vitamin C, što je u ovom radu i dokazano.



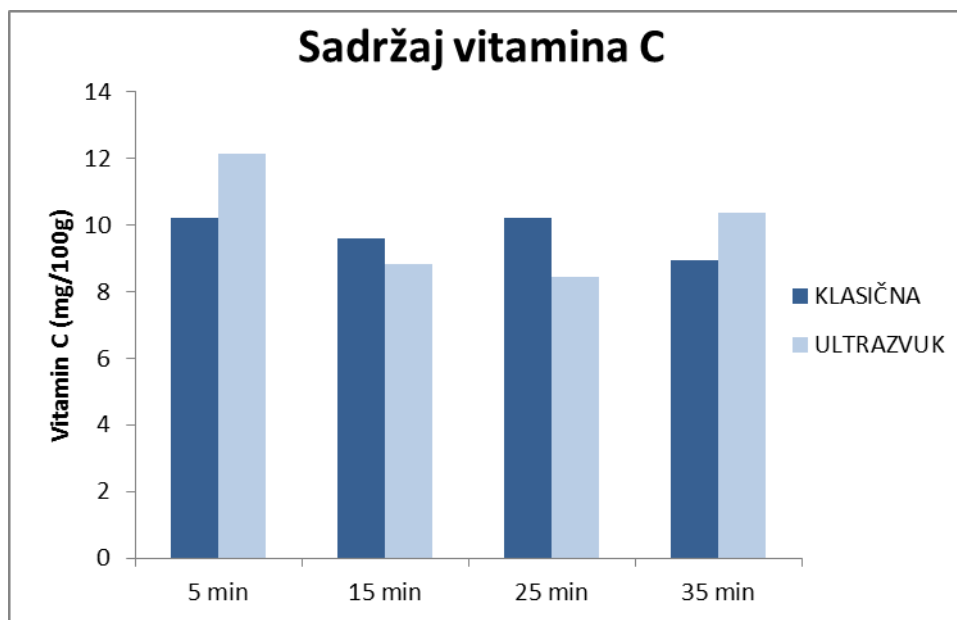
Grafikon 3. Sadržaj vitamina C (mg/100g) vodenih uzoraka (A1, A2, A3 i A4) pri sobnoj temperaturi (21,4 °C) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



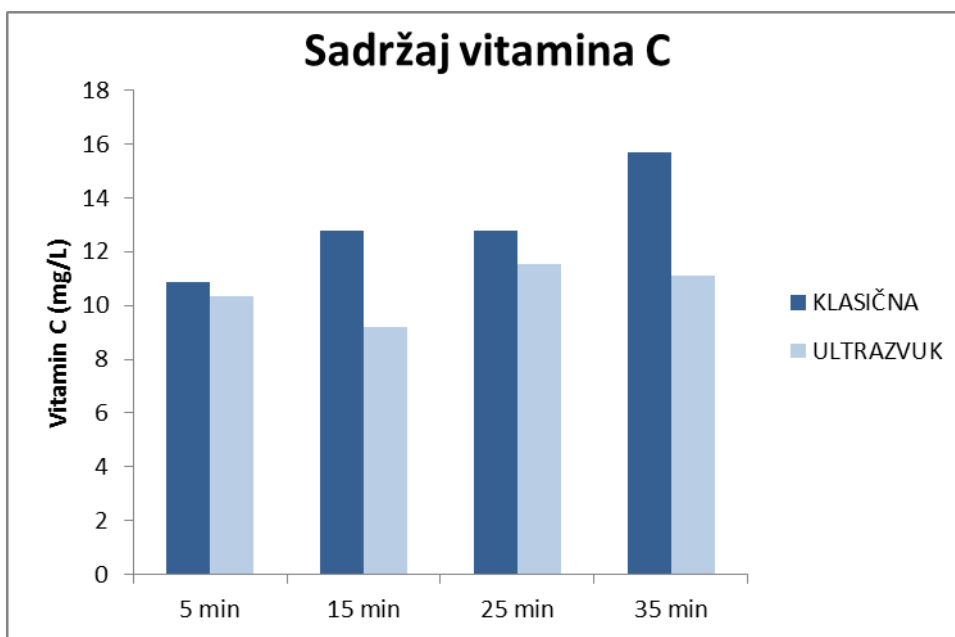
Grafikon 4. Sadržaj vitamina C (mg/100g) vodenih uzoraka (A5, A6, A7 i A8) pri 40 °C cvat kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



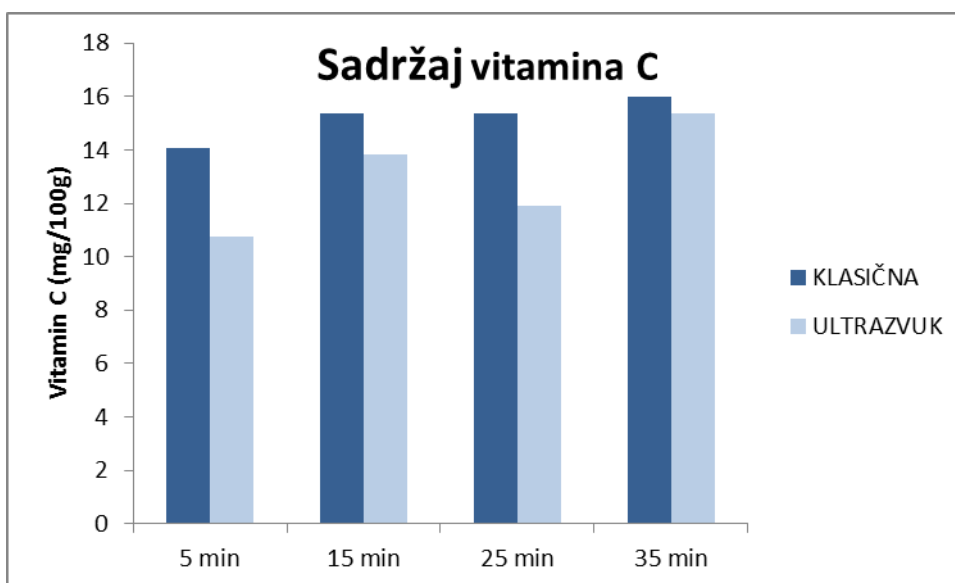
Grafikon 5. Sadržaj vitamina C (mg/100g) vodenih uzoraka (A9, A10, A11 i A12) pri 60 °C cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



Grafikon 6. Sadržaj vitamina C (mg/100g) u 20 %-tnim etanolnim uzorcima (a13, a14, a15 i a16) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



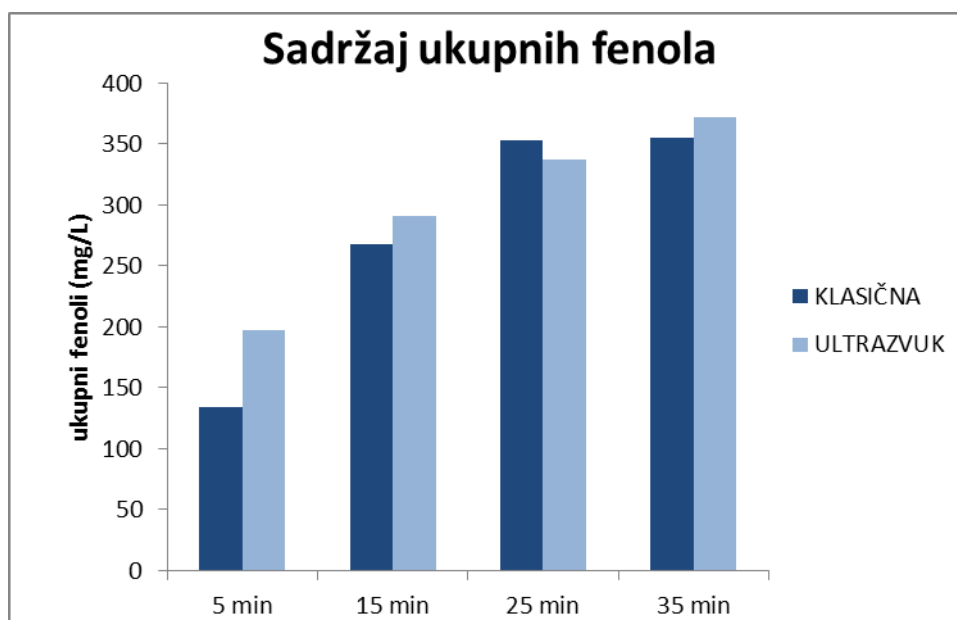
Grafikon 7. Sadržaj vitamina C (mg/100g) u 50 %-tnim etanolnim uzorcima (a17, a18, a19 i a20) cvat kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



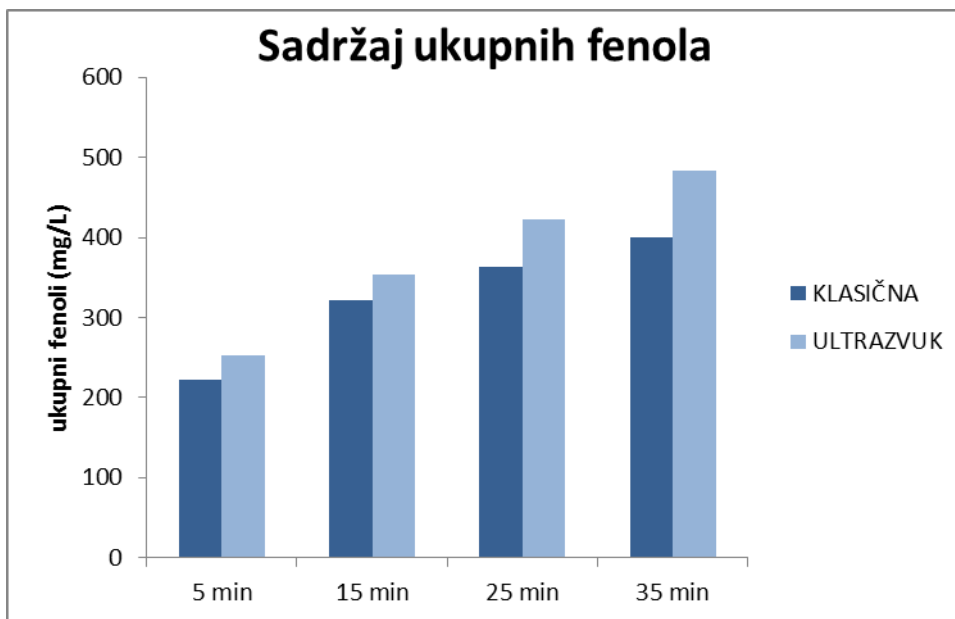
Grafikon 8. Sadržaj vitamina C (mg/100 g) u 80 %-tnim etanolnim uzorcima (a21, a22, a23 i a24) cvat kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

### 5.2.2. Sadržaj ukupnih fenola, flavonoida i neflavonoida

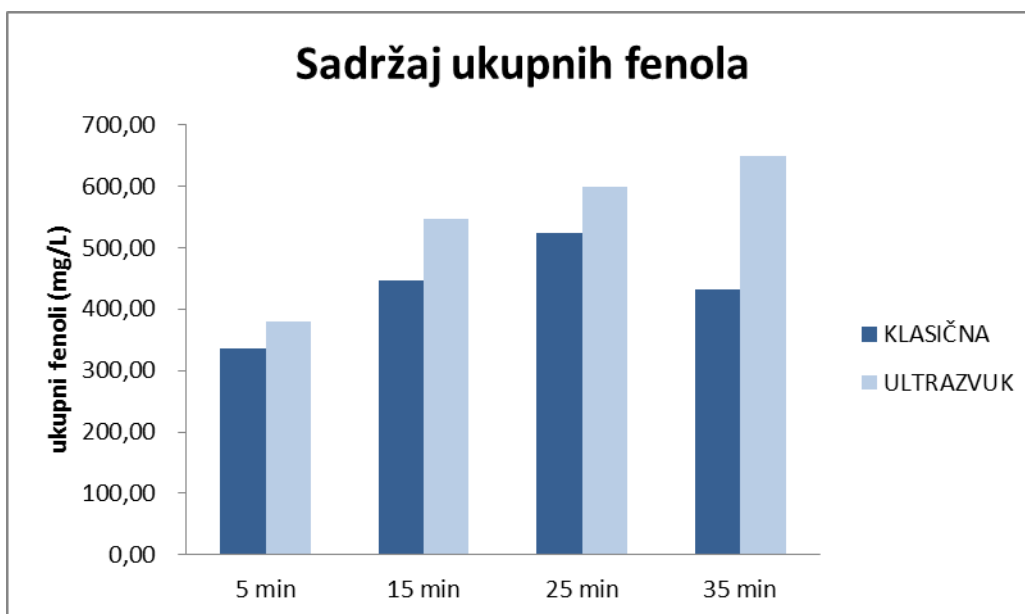
Vrijednosti sadržaja ukupnih fenola (mg/L) u uzorcima usitnjenog cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom prikazani u Grafikonima od 9 do 14. Sadržaj ukupnih fenola vodenih uzoraka ekstrahiranih klasično kreće se u rasponu od 133,60 (A1) do 523,28 (A11) mg/L, a etanolnih uzoraka od 239,43 (a13) do 693,92 (a20) mg/L. Primjenom ultrazvuka sadržaj ukupnih fenola vodenih uzoraka kretao se u rasponu od 197,49 (B1) do 649,07 (B12) mg/L, a etanolnih u rasponu od 314,63 (b21) do 718,63 (b20) mg/L. Najviša vrijednost ukupnih fenola (718,63 mg/L) utvrđena je u etanolnom uzorku (b20) u kojem su cvatovi kamilice ekstrahirani ultrazvukom u trajanju od 35 minuta. Najniža vrijednost ukupnih fenola 133,60 mg/L utvrđena je u uzorku (A1) ekstrahiranom klasično u trajanju od 5 minuta. Temeljem navedenog, može se zaključiti da ultrazvučni tretman značajno doprinosi ekstrakciji fenolnih spojeva iz cvata kamilice u usporedbi s klasičnom. Važno je naglasiti kako su općenito uređaji s direktnim uranjanjem sonde već s upola manjom frekvencijom učinkovitiji od ultrazvučnih kupelji (Drmić i Režek Jambrak, 2010). Fenolni spojevi pokazuju visok stupanj degradacije kada je riječ o tehnologijskim procesima, odnosno pokazuju izrazitu termolabilnost, osjetljivost na svjetlo, utjecaj patogena, mehaničko oštećenje tkiva biljne stanice itd., pa ih je tijekom konvencionalnih tehnika prerade vrlo teško sačuvati. Iz navedenog razloga tehnike minimalnog procesiranja hrane koje su usmjerene prema upotrebi neinvazivnih toplinskih procesa tijekom kojih se razvija što manja temperatura u konačnici neće dovesti do reduciranja sadržaja fenolnih spojeva neke sirovine (Šić Žlabur, 2015). Povećanjem temperature i vremena tretiranja uzoraka sadržaj fenolnih spojeva je rastao. Uzorci u kojima je bio 50 %-tni etanol i koji su tretirani ultrazvukom pokazali su visoke vrijednosti fenola.



Grafikon 9. Sadržaj ukupnih fenola (mg/L) vodenih uzoraka (A1, A2, A3 i A4) pri sobnoj temperaturi (21,4 °C) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

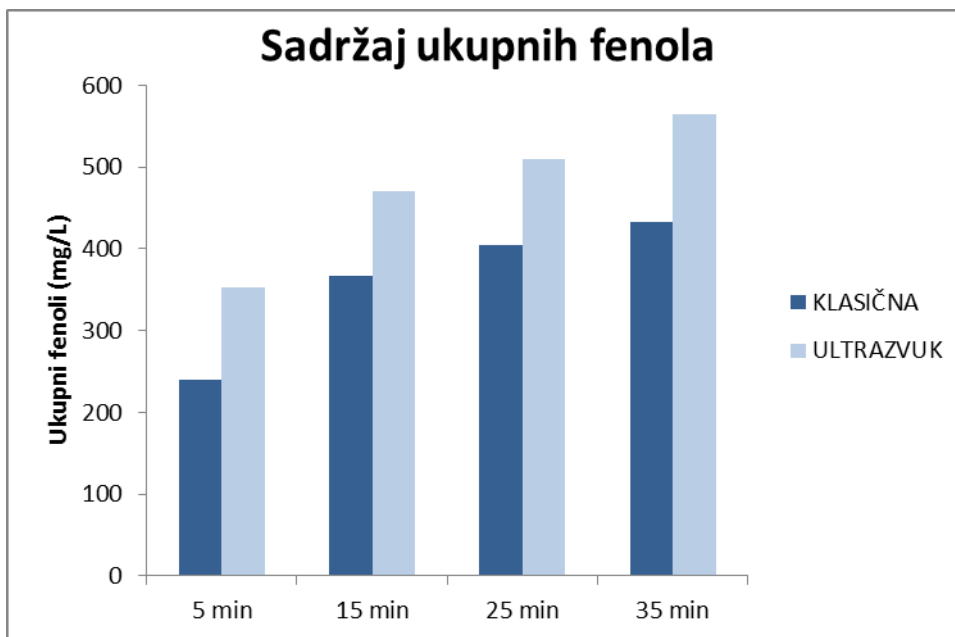


Grafikon 10. Sadržaj ukupnih fenola (mg/L) vodenih uzoraka (A5, A6, A7 i A8) pri 40 °C cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

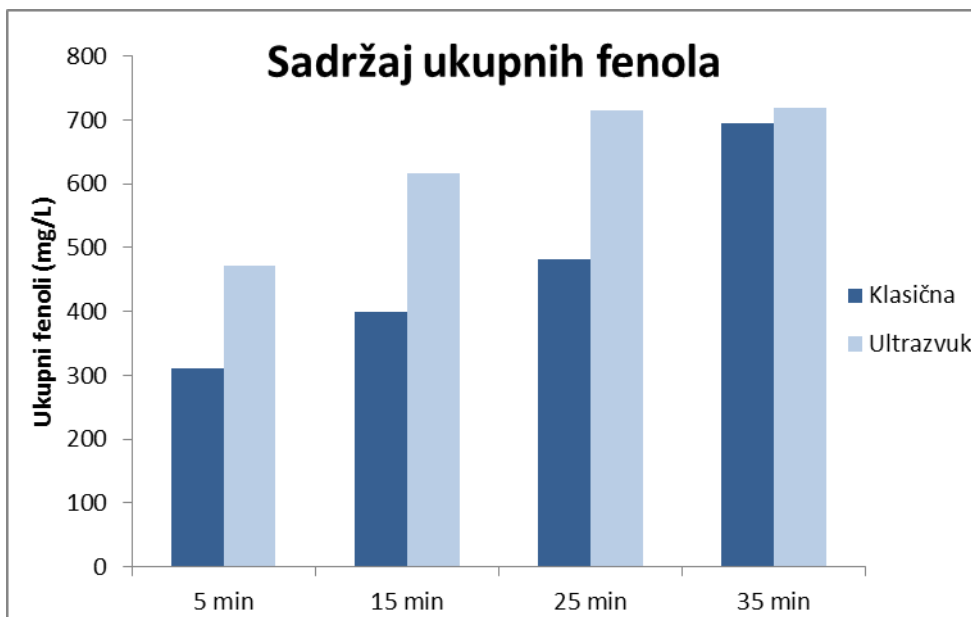


Grafikon 11. Sadržaj ukupnih fenola (mg/L) vodenih uzoraka (A9, A10, A11 i A12) pri 60 °C cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

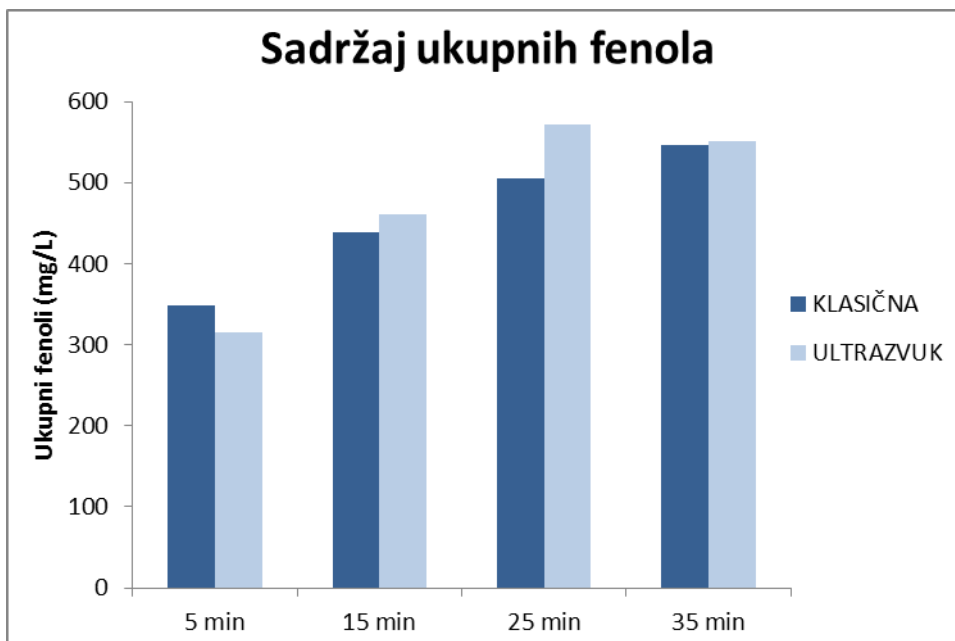




Grafikon 12. Sadržaj ukupnih fenola (mg/L) u 20 %-tnim etanolnim uzorcima (a13, a14, a15 i a16) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

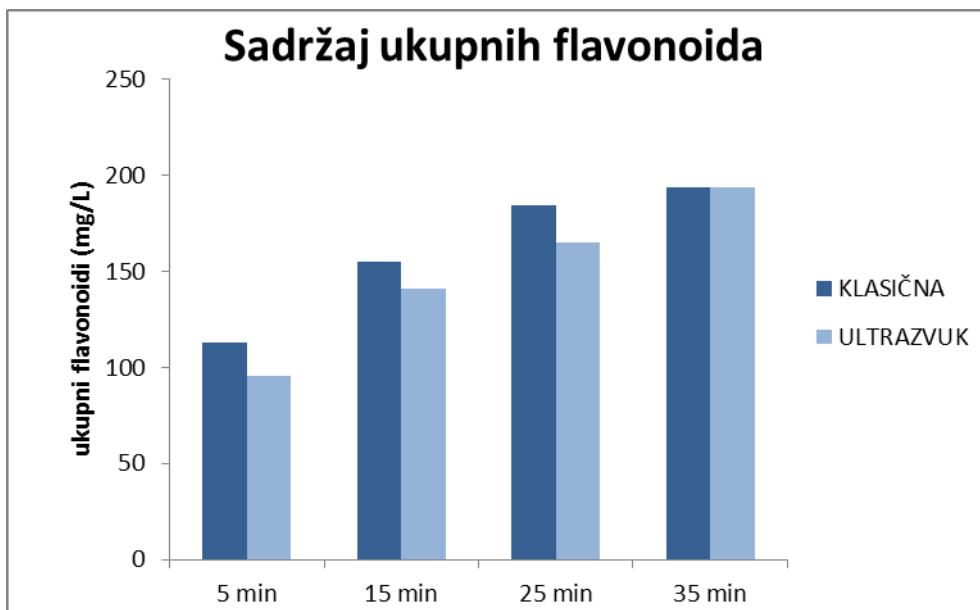


Grafikon 13. Sadržaj ukupnih fenola (mg/L) u 50 %-tnim etanolnim uzorcima (a17, a18, a19 i a20) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

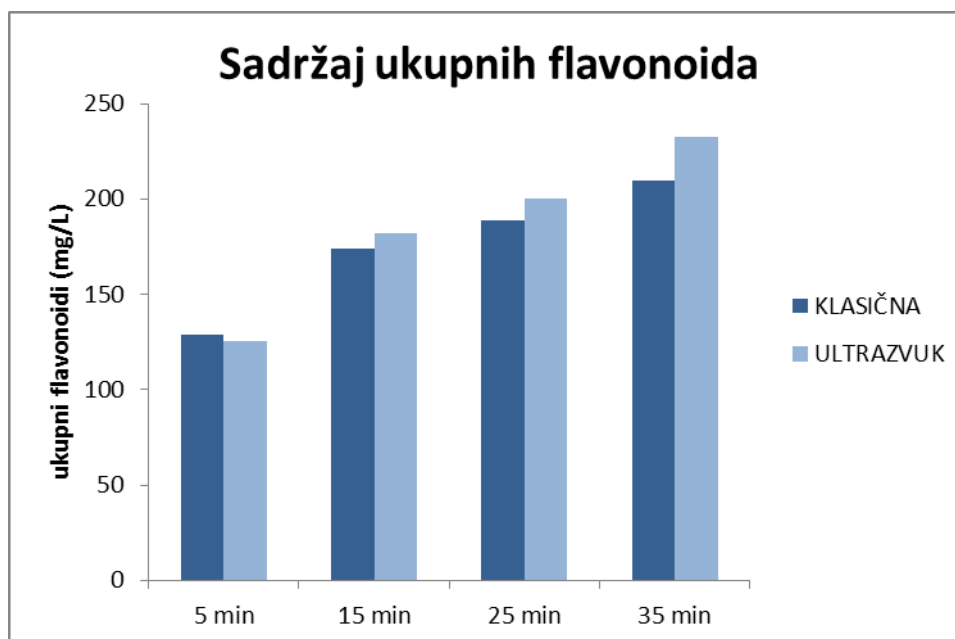


Grafikon 14. Sadržaj ukupnih fenola (mg/L) u 80 %-tnim etanolnim uzorcima (a21, a22, a23 i a24) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

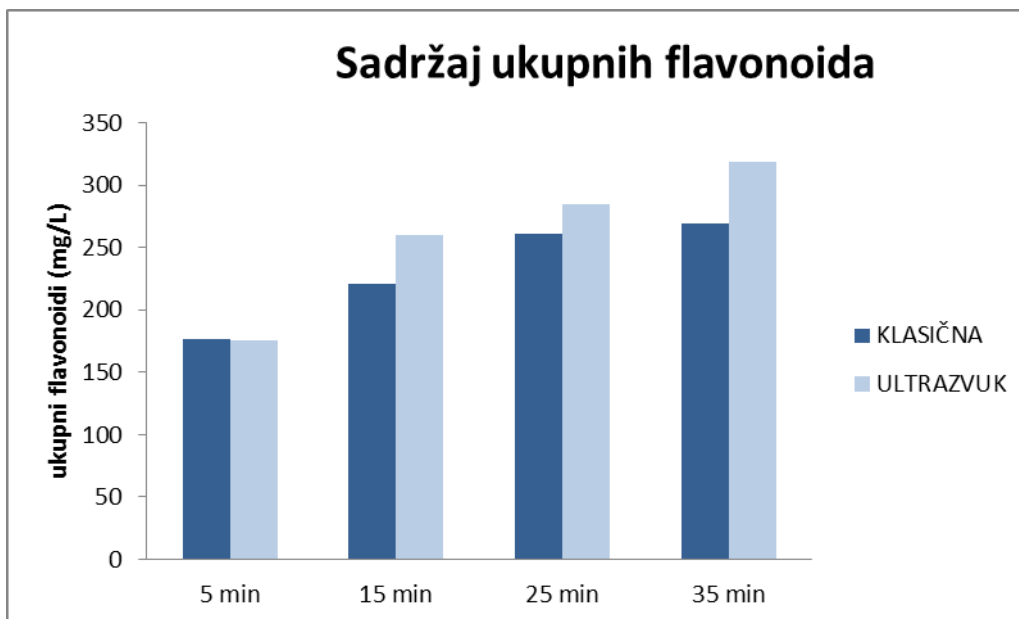
Vrijednosti sadržaja flavonoida (mg/L) u uzorcima usitnjenog cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom prikazani su u Grafikonima od 15 do 20. Vrijednosti vodenih uzoraka iznosi 113,14 (A1) do 269,53 (A12) mg/L, a etanolnih uzoraka iznosi 84,11 (a13) do 325,92 (a20) mg/L ekstrahiranih klasično, a vodeni uzorci ekstrahirani ultrazvukom kreću se u rasponu od 95,27 (B1) do 318,78 (B12) mg/L, a etanolni uzorci ekstrahirani ultrazvukom u rasponu od 148,74 (b21) do 387,45 (b20). Najviša vrijednost sadržaja flavonoida 387,54 utvrđena je u uzorku (a20) u kojem su usitnjeni cvatovi kamilice ekstrahirani klasično. Najniža vrijednost sadržaja flavonoida 84,11 mg/L utvrđena je u uzorku (a13) ekstrahiranim klasično u trajanju od 5 minuta. Od uzoraka tretiranih ultrazvukom, najviša vrijednost sadržaja flavonoida iznosi 387,45 utvrđena je za uzorak (b20) tretiran ultrazvukom u trajanju od 35 minuta. U ovom istraživanju može se zaključiti da je ultrazvučna kupelj doprinijela povećanju sadržaja flavonoida u ispitivanim uzorcima. Povećanjem temperature i vremena tretiranja rastao je i sadržaj flavonoida, a uzorci sa 50 %-tnim etanolom pokazali su više vrijednosti od 20 i 80 %-tnog etanola.



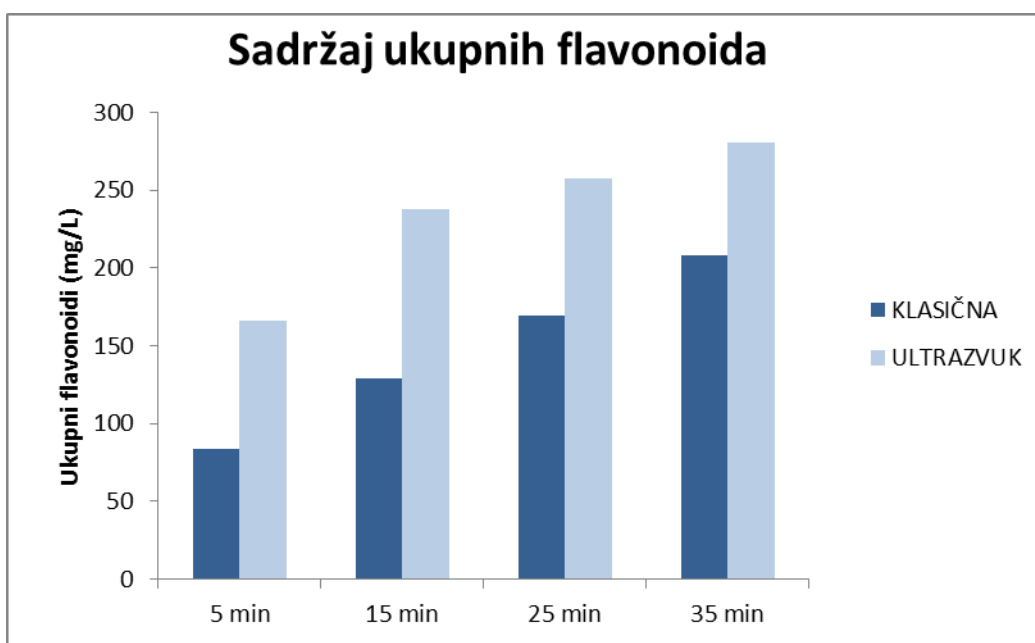
Grafikon 15. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg/L) vodenih uzoraka (A1, A2, A3 i A4) pri sobnoj temperaturi (21,4 °C) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



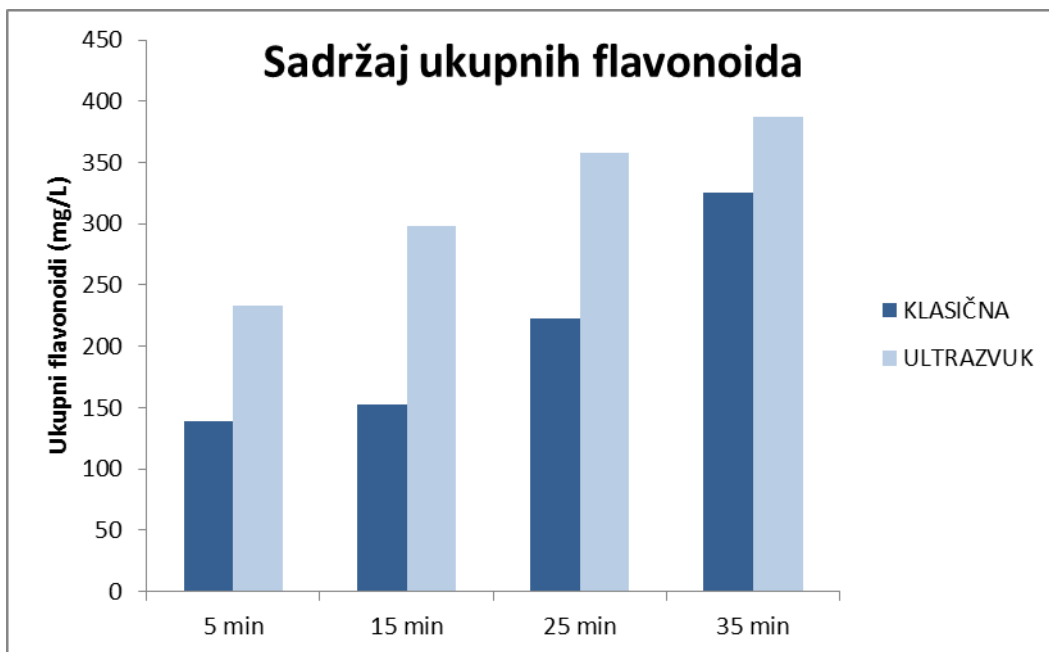
Grafikon 16. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg/L) vodenih uzoraka (A5, A6, A7 i A8) pri 40 °C cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



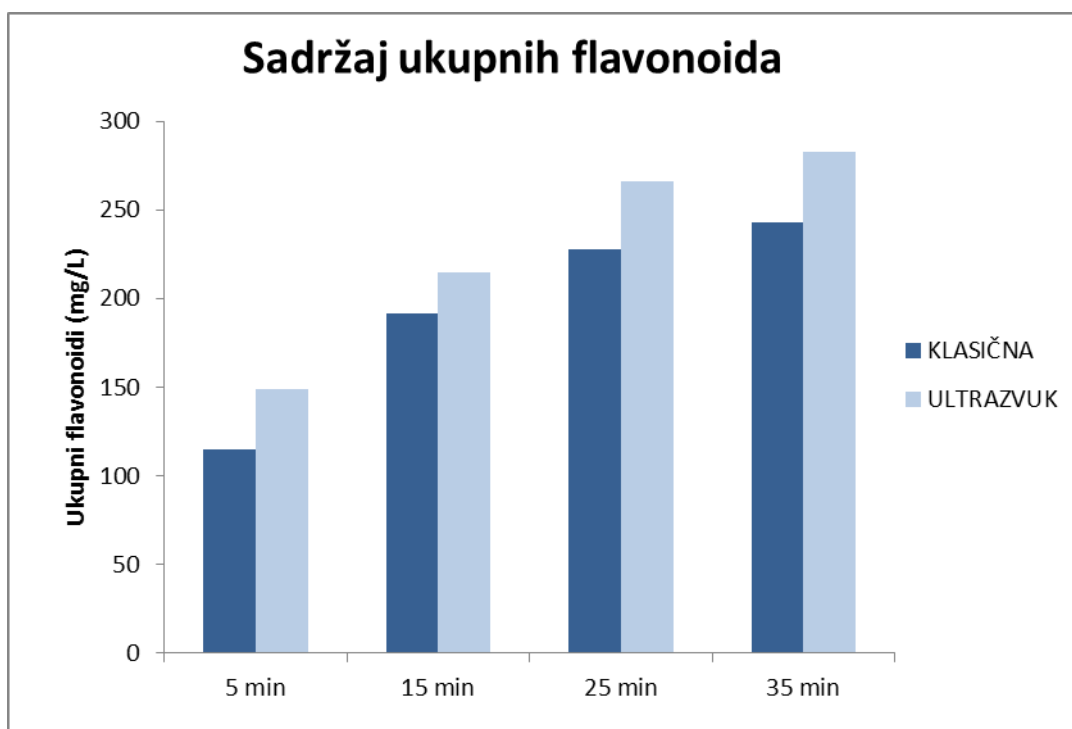
Grafikon 17. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg/L) vodenih uzoraka (A9, A10, A11 i A12) pri 60 °C cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



Grafikon 18. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg/L) u 20 %-tnim etanolnim uzorcima (a13, a14, a15 i a16) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



Grafikon 19. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg/L) u 50 %-tnim etanolnim uzorcima (a17, a18, a19 i a20) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



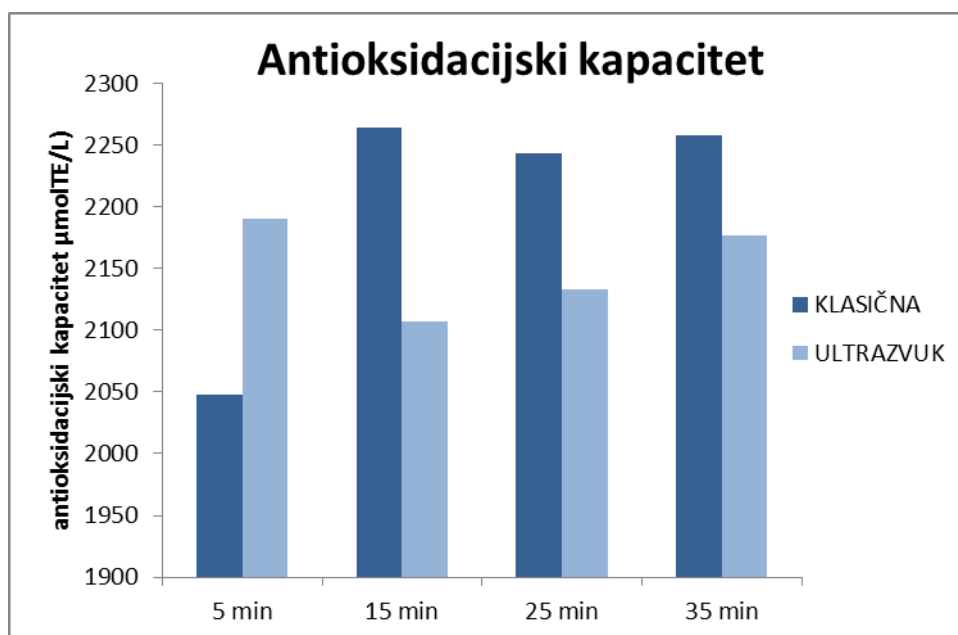
Grafikon 20. Sadržaj ukupnih flavonoida (mg/L) u 80 %-tnim etanolnim uzorcima (a21, a22, a23 i a24) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

Sadržaj neflavonoida u (klasično i ultrazvukom) ekstrahiranim vodenim uzorcima kreću se u rasponu od 20,46 mg/L (uzorak klasične ekstrakcije od 5 minuta) do 330,29 mg/L (uzorak klasične ekstrakcije od 35 minuta), a sadržaj neflavonoida u etanolnim uzorcima ekstrahiranih (klasično i ultrazvukom) od 155,33 mg/L (uzorak klasične ekstrakcije od 5 minuta) do 367,99 mg/L (uzorak klasične ekstrakcije od 35 minuta). Najviši sadržaj neflavonoida 367,99 mg/L utvrđen je u uzorku kojem su usitnjeni cvatovi kamilice ekstrahirani klasično. Najniža vrijednost neflavonoida 20,46 mg/L utvrđena je u uzorku tretiranim klasično u trajanju od 5 minuta. Temeljem navedenog može se zaključiti da su uzorci sa etanolom imali značajno veće vrijednosti sadržaja neflavonoida za razliku od vodenih uzoraka, te da je tretiranje ultrazvukom također pridonijelo tom povećanju.

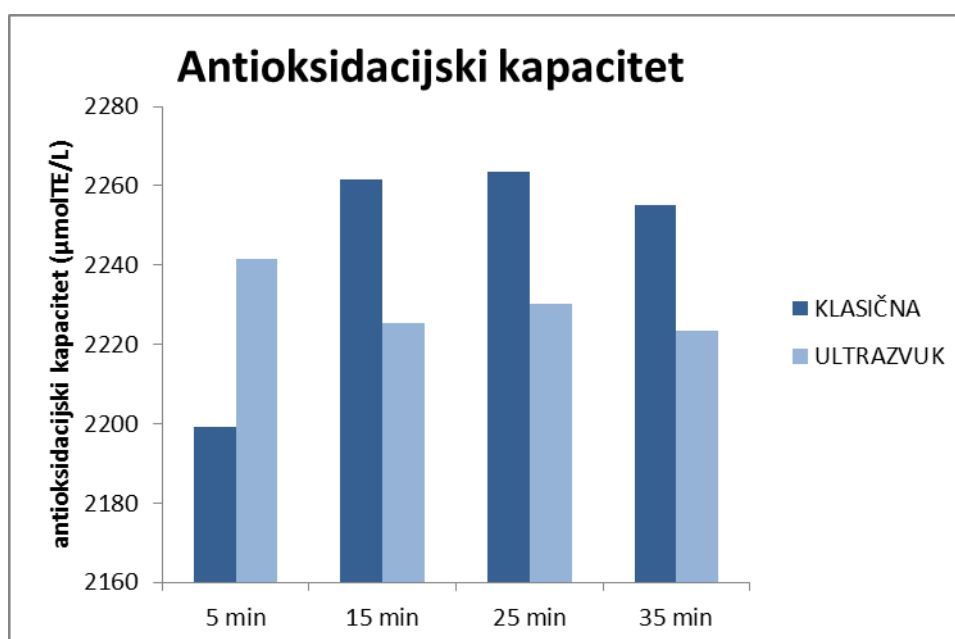
### **5.3. Antioksidacijski kapacitet vodenih i etanolnih uzoraka usitnjenog cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom**

Antioksidacijsko djelovanje biljnih vrsta u izravnoj je korelaciji sa sadržajem vitamina, biljnih pigmenata i različitih fenolnih fitokemikalija, poput flavonoida, glikozida, alkaloida i drugih. Odnosno, biljne vrste koje posjeduju veći sadržaj navedenih spojeva pokazuju i veću antioksidacijsku aktivnost (Lejla i sur., 2007; Šic Žlabur i sur., 2016).

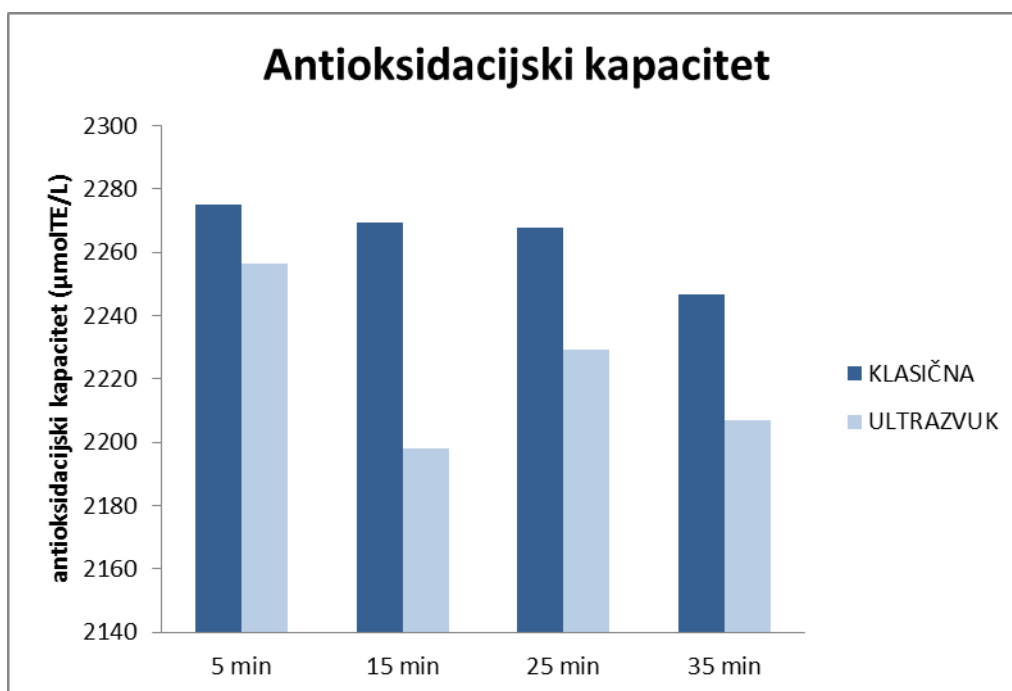
Kod istraživanih uzoraka utvrđene su značajne statističke razlike ( $p \leq 0,0001$ ) (Tablica 3 i 4) u antioksidacijskom kapacitetu s obzirom na način ekstrakcije. Najviši antioksidacijski kapacitet 2275,20  $\mu\text{mol TE/L}$  utvrđen je u vodenom uzorku (A9) u kojem su cvatovi kamilice ekstrahirani klasično u vremenskom periodu od 5 minuta. Najniži antioksidacijski kapacitet 2048,02  $\mu\text{mol TE/L}$  utvrđen je u uzorku (A1) tretiranim klasično u trajanju od 5 minuta. Kod vodenih uzoraka tretmani ultrazvukom nisu značajno utjecali na povećanje sadržaja antioksidacijskog kapaciteta, dok su etanolni uzorci rezultirali tom povećanju.



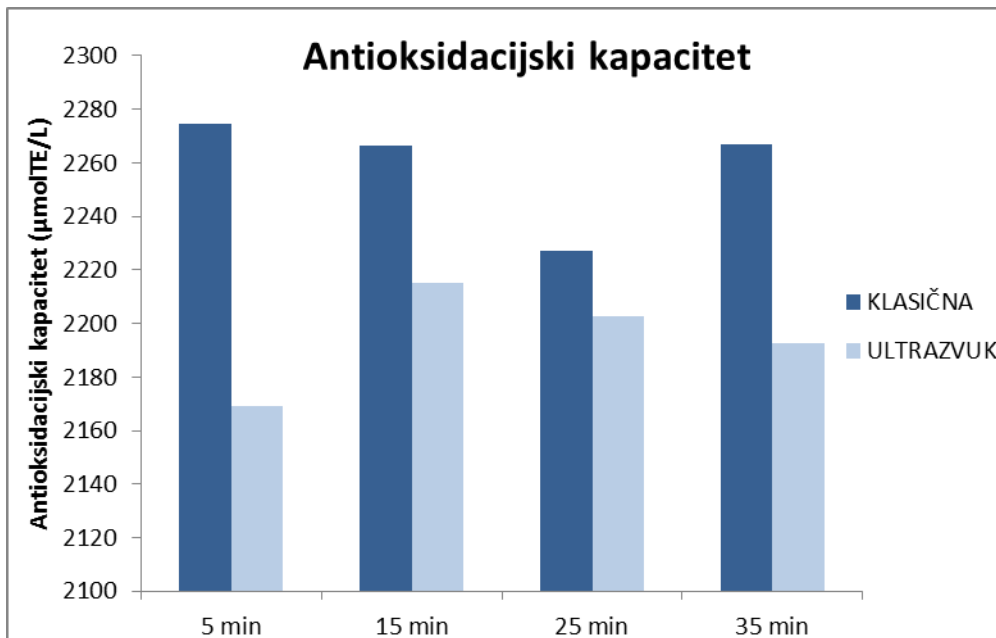
Grafikon 21. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ( $\mu\text{molTE/L}$ ) vodenih uzoraka (A1, A2, A3 i A4) pri sobnoj temperaturi ( $21,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



Grafikon 22. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ( $\mu\text{molTE/L}$ ) vodenih uzoraka (A5, A6, A7 i A8) pri  $40\text{ }^{\circ}\text{C}$  cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

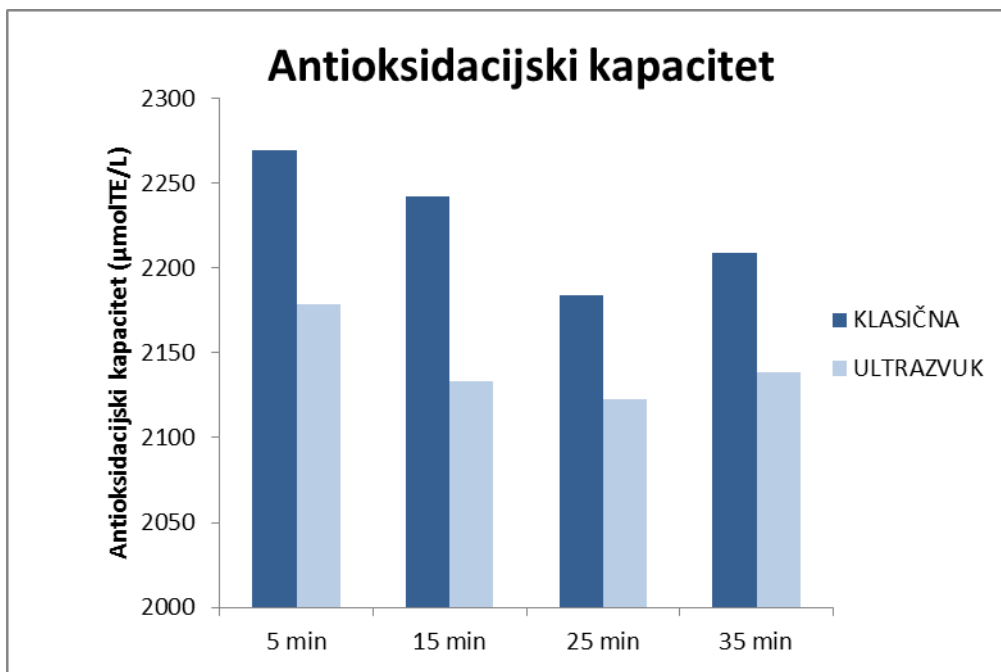


Grafikon 23. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ( $\mu\text{molTE/L}$ ) vodenih uzoraka (A9, A10, A11 i A12) pri 60°C cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

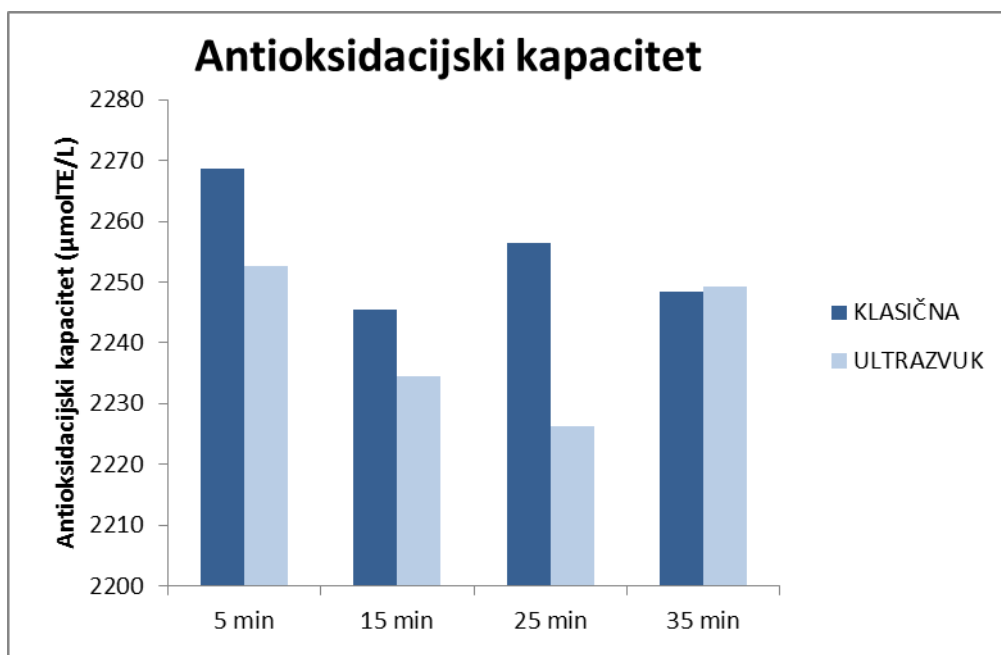


Grafikon 24. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ( $\mu\text{molTE/L}$ ) u 20 %-tnim etanolnim uzorcima (a13, a14, a15 i a16) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta





Grafikon 25. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ( $\mu\text{molTE/L}$ ) u 50 %-tnim etanolnim uzorcima (a17, a18, a19 i a20) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta



Grafikon 26. Vrijednosti antioksidacijske aktivnosti ( $\mu\text{molTE/L}$ ) u 80 %-tnim etanolnim uzorcima (a21, a22, a23 i a24) cvata kamilice ekstrahiranih klasično i ultrazvukom visokog intenziteta u vremenskom periodu od 5 do 35 minuta

## 6.0. Zaključci

Na temelju ostvarenih rezultata provedenog istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Gustoća u uzorcima sa vodom je veća u odnosu na gustoću u uzorci sa etanolom pa se stoga kamilica bolje otapala u etanolu. Najbolji rezultati postignuti su sa 50% etanolom. Vodeni i etanolni ekstrakti nisu bogat izvor šećera. Ovisno o vremenskim periodima (5 – 35 minuta) uzorci tretirani ultrazvukom pokazuju trend rasta topljive suhe tvari. Vodeni uzorci tretirani ultrazvukom rezultirali su povećanju sadržaja ukupnih kiselina u odnosu na klasičan tretman.
2. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta utječe na povećanje sadržaja ukupnih fenola i flavonoida i u etanolnim i vodenim uzorcima cvatova kamilice
3. Primjena ultrazvuka visokog intenziteta značajno je smanjila vrijeme potrebno za ekstrakciju fenolnih spojeva.
4. Ultrazvuk nije značajno utjecao na sadržaj vitamina C. Najviše vrijednosti sadržaja vitamin C izmjerene su u 80 %-tnom uzorku koji je ekstrahiran klasično u trajanju od 35 minuta. Na temelju navedenog može se zaključiti da je otapalo i produljeno vrijeme tretiranja rezultiralo povećanju sadržaja vitamina C.
5. Najviše vrijednosti sadržaja fenola izmjerene su u 50 %-tnom uzorku koji je ekstrahiran ultrazvukom u trajanju od 35 minuta. Možemo zaključiti da je produljeno vrijeme tretiranja uzorka i povišenje temperature ultrazvuka pridonijele povećanju sadržaja fenola.
6. Budući da je ultrazvuk povećao sadržaj fenola koji doprinosi antioksidacijskom kapacitetu, najviši sadržaj antioksidacijskog kapaciteta dokazan je u uzorku koji je ekstrahiran klasično, na temelju čega možemo zaključiti da ultrazvuk nije utjecao na povećanje istog.

Na temelju ispitanog, može se zaključiti da analizirani usitnjeni cvat kamilice ima bogat sadržaj bioaktivnih spojeva. Ultrazvučna ekstrakcija znatno je povećala sadržaj fenola, flavonoida i neflavonoida, za razliku od klasične ekstrakcije, što je i bio cilj ovog rada.

## 7.0. Popis literature

1. AOAC (1995). Official methods of Analysis (16th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.
2. AOAC (2002). Official methods of Analysis (17th ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, USA.
3. Das M. (2015) Chamomile: Medicinal, biochemical and agricultural aspects. CRC Press Taylor & Francis Group, Boca Raton, SAD.
4. Drmić H., Režek Jambrak A. (2010). Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva. Croatian Journal of Food Science and Technology, 2(2): 22-33.
5. Gertenbach D.D. (2001). Solid-liquid extraction technologies from botanicals. U: Shi J., Mazza G., Le Maguer M. (ur.): Functional foods: Biochemical and processing aspects. CRC Press Inc. Boca Raton, SAD, pp. 331-366.
6. McKay D.L., Blumberg J.B. (2006) A review of the bioactivity and potential health benefits of chamomile tea (*Matricaria recutita* L.). Phytotherapy Research 20(7): 519-30.
7. Mendešević N. (2017). Antioksidacijska aktivnost i sadržaj umbeliferona ekstrakata kamilice dobivenih primjenom različitih tehnika ekstrakcije. Diplomski rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek.
8. Singh O., Khanam Z., Misra N., Sarivastava M.K. (2011). Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. Pharmacognosy Review, 5(9): 82-95.
9. Sarivastava J.K., Gupta S. (2009). Extraction characterization stability and biological activity of flavonoids isolated from chamomile flowers. Molecular and Cellular Pharmacology, 1; 1(3): 138.
10. SAS/STAT (2010). SAS Institute, Cary, NC, USA.
11. Suslick K.S., Eddingsaas N.C., Flannigan D.J., Hopkins S.D., Xu H. (2011). Extreme conditions during multibubble cavitation: Sonoluminescence as a spectroscopic probe. Ultrasonics Sonochemistry, 18: 842-846.
12. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Rimac Brnčić S., Dujmić F., Brnčić M. (2015). Optimization of ultrasound assisted extraction of functional ingredients from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. International Agrophysics, 29(2): 231-237.
13. Šic Žlabur J., Voća S., Dobričević N., Pliestić S., Galić A., Boričević A., Borić N. (2016). Ultrasound assisted extraction od bioactive compounds from lemon balm and peppermint leaves. International Agrophysics, 30(1): 95-104.
14. Šilješ I., Grozdanić Đ., Grgesina I. (1992). Poznavanje, uzgoj i prerada ljekovitog bilja. Školska knjiga, Zagreb.
15. Villamiel M., Hamersveld V., De Jong P. (1999). Review: Effect of ultrasound processing and the quality of dairy products. Milchwissenschaft, 54: 69-73.
16. Vinatoru M. (2001). An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. Ultrasonics Sonochemistry, 8: 303-313.

#### Internetski izvori:

1. Europlantaže (2017). Berba cvijeta kamilice.  
<http://www.europlantaze.com/index.php/en/eko/96-berba-cvijeta-kamilice> (Pristupljeno 30.5.2017).
2. FCD (2015). Flora Croatica Data Base. Kamilica.  
[https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=6295&taxon=Chamomilla+recutita+\(L.\)+Rauschert](https://hirc.botanic.hr/fcd/DetaljiFrame.aspx?IdVrste=6295&taxon=Chamomilla+recutita+(L.)+Rauschert) (Pristupljeno 18.9.2017).
3. HL (2017). Hrvatski leksikon. <https://www.hrleksikon.info/definicija/farmakopeja.html>

#### Izvori slika:

1. <http://www.gobotany.newenglandwild.org/species/matricaria/chamomilla/>  
(Pristupljeno 20.7.2017).
2. <http://www.terra-organica.hr/kamilica-njemacka-chamomilla-recutita-hidrolat-bio-cvjetna-vodica-florihana.html> (Pristupljeno 1.6.2017).

## 8.0. Prilog

Tablica 5. Sadržaj bioaktivnih komponenti i antioksidacijski kapacitet vodenih i etanolnih uzoraka usitnjenog cvata kamilice ekstrahiranih klasično

Uzorak	Vitami C (mg/100g) ***	Uk. Fenoli (mgGAE/100g) ***	Flavonoidi ***	Neflavonoidi ***	Anti. kapacitet ( $\mu$ mol TE/L) ***
A1	9,1000 <sup>f, g, h, i, j, k, l</sup> ±3,11	133,6000 <sup>m</sup> ±0,4	113,145 <sup>f</sup> ±0,40	20,455 <sup>d</sup> ±0,85	2048,020 <sup>v</sup> ±49,62
A2	10,9850 <sup>c, d, e, f, g</sup> ±0,44	267,5800 <sup>h</sup> ±0,9	154,765 <sup>a</sup> ±5,01	112,815 <sup>a</sup> ±5,91	2263,500 <sup>a, b, c, d</sup> ±10,82
A3	10,3550 <sup>d, e, f, g, i</sup> ±0,44	352,8850 <sup>a</sup> ±0,70	184,125 <sup>v</sup> ±0,60	168,760 <sup>u, v</sup> ±1,30	2243,035 <sup>b, c, d, e, f, g, h, i</sup> ±0,32
A4	8,4750 <sup>h, i, j, k, l, m, n</sup> ±0,44	354,8000 <sup>a</sup> ±0,30	193,870 <sup>u</sup> ±0,55	160,925 <sup>w</sup> ±0,85	2258,050 <sup>a, b, c, d, e</sup> ±0,71
A5	7,8450 <sup>j, k, l, m, n, o</sup> ±0,44	222,0600 <sup>k</sup> ±0,80	128,745 <sup>d</sup> ±0,90	93,315 <sup>c</sup> ±1,70	2199,170 <sup>n, o, p, r, q</sup> ±31,17
A6	10,9850 <sup>c, d, e, f, g</sup> ±0,44	321,1550 <sup>c</sup> ±0,05	173,880 <sup>x</sup> ±0,45	147,275 <sup>y</sup> ±0,40	2261,475 <sup>a, b, c, d</sup> ±0,32
A7	10,3550 <sup>d, e, f, g, i</sup> ±0,44	362,9900 <sup>z</sup> ±0,25	188,520 <sup>u</sup>	147,470 <sup>u</sup> ±0,25	2263,500 <sup>a, b, c, d</sup> ±3,18
A8	10,6700 <sup>c, d, e, f, g, h</sup> ±0,44	399,4000 <sup>v</sup> ±0,90	209,615 <sup>z</sup> ±1,05	189,785 <sup>z</sup> ±0,15	2255,175 <sup>a, b, c, d, e, f, g</sup> ±5,40
A9	10,0400 <sup>d, e, f, h, g, i, j</sup>	335,1600 <sup>c</sup> ±0,20	176,960 <sup>w</sup> ±0,30	158,200 <sup>x, y</sup> ±0,10	2275,195 <sup>a</sup> ±9,54
A10	10,6700 <sup>c, d, e, f, g, h</sup>	446,4100 <sup>q</sup>	221,105 <sup>p</sup> ±0,15	225,315 <sup>p</sup> ±0,15	2269,575 <sup>a, b</sup> ±0,32
A11	10,0400 <sup>d, e, f, h, g, i, j</sup>	523,2800 <sup>k</sup> ±0,30	261,415 <sup>i</sup> ±0,20	261,865 <sup>i</sup> ±0,10	2267,775 <sup>a, b, c, d</sup> ±0,95
A12	10,0400 <sup>d, e, f, h, g, i, j</sup>	431,3850 <sup>s</sup> ±0,50	269,530 <sup>h</sup> ±0,55	161,845 <sup>w</sup> ±0,05	2246,855 <sup>b, c, d, e, f, g, h, i</sup> ±3,18
a13	10,2300 <sup>d, e, f, h, g, i</sup>	239,4350 <sup>j</sup> ±0,40	84,110 <sup>h</sup> ±0,55	155,325 <sup>x</sup> ±0,95	2274,520 <sup>a</sup> ±15,59
a14	9,5900 <sup>e, f, g, h, i, j, k</sup> ±0,90	366,9600 <sup>y</sup> ±0,35	128,670 <sup>d</sup>	238,290 <sup>m</sup> ±0,35	2266,650 <sup>a, b, c, d</sup> ±3,18
a15	10,2300 <sup>d, e, f, h, g, i</sup> ±0,90	405,3950 <sup>u</sup> ±0,35	169,475 <sup>y</sup> ±0,25	235,915 <sup>m, n, o</sup> ±1,60	2227,285 <sup>h, i, j, k, l, m</sup> ±4,14
a16	8,9500 <sup>f, g, h, i, j, k, l, m</sup>	432,6250 <sup>s</sup> ±1,76	208,020 <sup>z</sup> ±0,20	224,605 <sup>p</sup> ±1,56	2266,875 <sup>a, b, c, d</sup> ±2,86
a17	10,8700 <sup>c, d, e, f, g</sup> ±0,90	310,8400 <sup>f</sup> ±0,10	138,635 <sup>c</sup> ±0,45	172,200 <sup>t, u</sup> ±0,55	2269,575 <sup>a, b</sup> ±0,32
a18	12,7900 <sup>b, c</sup>	399,6150 <sup>v</sup> ±0,70	152,890 <sup>a</sup> ±0,85	246,725 <sup>l</sup> ±1,55	2242,360 <sup>c, d, e, f, g, h, i</sup> ±0,64
a19	12,7900 <sup>b, c</sup>	482,6850 <sup>n</sup> ±0,15	222,415 <sup>p</sup> ±0,40	260,270 <sup>i</sup> ±0,55	2183,880 <sup>f, s, q</sup>
a20	15,6700 <sup>a</sup> ±1,36	693,9200 <sup>c</sup> ±1,05	325,925 <sup>c</sup> ±0,58	367,990 <sup>a</sup> ±1,64	2209,070 <sup>k, l, m, n, o, p, q</sup>
a21	14,0700 <sup>a, b</sup>	348,6300 <sup>b</sup> ±0,30	114,565 <sup>l</sup> ±2,80	234,070 <sup>n, o</sup> ±2,51	2268,675 <sup>a, b, c</sup> ±0,32
a22	15,3500 <sup>a</sup>	438,7550 <sup>r</sup> ±0,90	191,605 <sup>z</sup> ±0,45	247,150 <sup>k, l</sup> ±1,35	2245,505 <sup>b, c, d, e, f, g, h, i</sup> ±0,64
a23	15,3500 <sup>a</sup>	504,9850 <sup>m</sup> ±0,6	227,520 <sup>o</sup> ±0,70	277,465 <sup>g</sup> ±0,10	2256,525 <sup>a, b, c, d, e, f</sup> ±0,95
a24	15,9900 <sup>a</sup> ±0,90	546,0750 <sup>i</sup> ±1,25	243,225 <sup>l</sup> ±0,35	302,850 <sup>e</sup> ±0,90	2248,425 <sup>a, b, c, d, e, f, g, h, i</sup> ±0,32

\*\*\*p≤0,0001; Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti.

Tablica 6. Sadržaj bioaktivnih komponenti i antioksidacijski kapacitet vodenih i etanolnih uzoraka usitnjenog cvata kamilice ekstrahiranih ultrazvukom

Uzorak	Vitamin C (mg/100g) ***	Uk. Fenoli (mgGAE/100g) ***	Flavonoidi ***	Neflavonoidi ***	Anti. kapacitet ( $\mu\text{molTE/L}$ ) ***
B1	7,8100 <sup>k, l, m, n, o</sup>	197,4900 <sup>l</sup> ±0,15	95,275 <sup>g</sup> ±0,20	102,215 <sup>b</sup> ±0,05	2189,720 <sup>p, r, s, q</sup>
B2	9,4350 <sup>e, f, g, h, i, j, k</sup> ±0,46	291,1500 <sup>g</sup> ±0,44	141,295 <sup>c</sup> ±0,20	149,855 <sup>y</sup> ±0,24	2107,400 <sup>u</sup>
B3	6,1850 <sup>o</sup> ±0,46	337,1800 <sup>c</sup> ±0,85	165,295 <sup>z</sup> ±0,15	171,880 <sup>t, u</sup> ±1,00	2133,490 <sup>t, u</sup>
B4	7,8100 <sup>k, l, m, n, o</sup>	372,3850 <sup>a</sup> ±0,50	194,120 <sup>±</sup> 1,91	178,265 <sup>s</sup> ±2,41	2176,680 <sup>r, s</sup> ±0,64
B5	6,5100 <sup>n, o</sup>	252,8000 <sup>±</sup> 1,65	125,235 <sup>e</sup> ±0,35	127,565 <sup>z</sup> ±2,01	2241,460 <sup>d, e, f, g, h, i, j</sup> ±0,64
B6	6,8350 <sup>m, n, o</sup> ±0,46	353,9500 <sup>a</sup> ±2,61	182,175 <sup>v</sup> ±3,06	171,775 <sup>t, u</sup> ±0,45	2225,260 <sup>i, j, k, l, m, n</sup>
B7	6,5100 <sup>n, o</sup>	422,3050 <sup>±</sup> 1,00	200,080 <sup>s</sup>	222,230 <sup>p</sup> ±1,00	2230,210 <sup>f, g, h, i, j, k, l</sup>
B8	6,5100 <sup>n, o</sup>	482,6850 <sup>a</sup> ±0,25	232,200 <sup>±</sup> 0,90	250,480 <sup>j, k</sup> ±0,65	2223,515 <sup>i, j, k, l, m, n</sup> ±0,71
B9	7,1600 <sup>l, m, n, o</sup> ±0,92	379,0150 <sup>w</sup> ±0,25	175,900 <sup>x, w</sup> ±0,10	203,120 <sup>q</sup> ±0,35	2256,300 <sup>a, b, c, d, e, f</sup> ±0,64
B10	7,1600 <sup>l, m, n, o</sup> ±0,92	547,6350 <sup>±</sup> 0,15	260,525 <sup>±</sup> 0,05	287,110 <sup>f</sup> ±0,10	2198,240 <sup>o, p, r, q</sup> ±2,12
B11	6,5100 <sup>n, o</sup>	599,7500 <sup>f</sup> ±0,55	285,130 <sup>f</sup> ±0,55	314,620 <sup>d</sup>	2229,340 <sup>g, h, i, j, k, l, m</sup> ±0,68
B12	7,8100 <sup>k, l, m, n, o</sup>	649,0700 <sup>d</sup> ±0,30	318,780 <sup>d</sup> ±0,10	330,295 <sup>c</sup> ±0,40	2207,045 <sup>l, m, n, o, p, q</sup> ±0,32
b13	11,1350 <sup>c, d, e, f</sup> ±0,54	353,2750 <sup>a</sup> ±0,05	166,010 <sup>z</sup> ±0,45	187,270 <sup>r</sup> ±0,40	2169,030 <sup>s</sup> ±15,90
b14	8,8300 <sup>g, h, i, j, k, l, m</sup> ±1,62	470,2050 <sup>o</sup> ±0,15	237,800 <sup>m</sup> ±0,70	232,405 <sup>o</sup> ±0,85	2215,140 <sup>i, k, l, m, n, o, p</sup> ±7,95
b15	8,4450 <sup>i, j, k, l, m, n</sup> ±1,09	509,7700 <sup>±</sup> 0,25	257,375 <sup>k</sup> ±0,29	252,395 <sup>j</sup> ±0,04	2202,770 <sup>m, n, o, p, r, q</sup> ±3,18
b16	10,3650 <sup>d, e, f, h, g, i</sup> ±1,63	565,2200 <sup>h</sup> ±1,45	280,875 <sup>g</sup> ±0,95	284,340 <sup>f</sup> ±0,10	2192,645 <sup>p, r, s, q</sup> ±6,68
b17	10,3650 <sup>d, e, f, h, g, i</sup> ±0,54	470,9850 <sup>o</sup> ±0,25	233,440 <sup>±</sup> 0,35	237,540 <sup>m, n</sup> ±0,30	2178,930 <sup>r, s</sup> ±3,82
b18	9,2150 <sup>f, g, h, i, j, k, l</sup> ±2,17	615,3550 <sup>c</sup> ±0,46	298,605 <sup>e</sup> ±0,76	316,750 <sup>d</sup> ±0,30	2133,270 <sup>t, u</sup> ±11,13
b19	11,5200 <sup>c, d, e</sup> ±1,09	714,3400 <sup>b</sup> ±0,85	357,460 <sup>b</sup> ±0,85	356,885 <sup>b</sup> ±1,70	2122,700 <sup>t, u</sup> ±3,82
b20	11,1350 <sup>c, d, e, f</sup> ±0,54	718,6300 <sup>a</sup> ±0,40	387,450 <sup>a</sup> ±0,45	331,175 <sup>c</sup> ±0,05	2138,890 <sup>t</sup> ±5,73
b21	10,750 <sup>c, d, e, f, g</sup>	314,6300 <sup>e</sup> ±1,35	148,740 <sup>b</sup> ±1,20	165,890 <sup>v</sup> ±0,15	2252,705 <sup>a, b, c, d, e, f, g, h</sup> ±15,90
b22	13,8200 <sup>a, b</sup>	460,4900 <sup>p</sup> ±2,06	214,895 <sup>q</sup> ±0,60	245,590 <sup>l</sup> ±2,66	2234,485 <sup>k</sup> ±0,32
b23	11,9050 <sup>b, c, d</sup> ±0,54	571,3100 <sup>g</sup> ±0,64	266,340 <sup>±</sup> 0,35	304,965 <sup>e</sup> ±0,29	2226,160 <sup>h, i, j, k, l, m</sup> ±0,64
b24	15,3600 <sup>a</sup>	550,8600 <sup>±</sup> 0,80	282,615 <sup>f, g</sup> ±0,10	268,245 <sup>h</sup> ±0,90	2249,325 <sup>a, b, c, d, e, f, g, h, i</sup> ±1,59

\*\*\*p≤0,0001; Različita slova prikazuju značajne statističke razlike između srednjih vrijednosti.

## **Životopis**

Maja Pleša rođena je 16. ožujka 1993. godine u Sisku. Osnovnu školu pohađala je u Kutini. Nakon osnovne škole upisuje Tehničku školu u Kutini, smjer Ekološki tehničar. Upisuje Agronomski fakultet u Zagrebu, smjer Biljne znanosti. Završni rad odrađuje na Zavodu za povrćarstvo na temu „Tehnologija uzgoja cassave“. Nakon završenog preddiplomskog studija upisuje diplomski studij Hortikultura, smjer Povrćarstvo.